

Physiological responses and expression pattern of *SOS* genes of bread wheat to salt stress

Kobra Mokarian¹, Reza Maali-Amiri², Ali Peighambari², Mohammad Tagi Tabatabaee³, Fatemeh Daneshmand⁴

1,2. Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Tehran, Karaj, Iran,
3. Agricultural and Natural Resources Research and Education Center (AREEO), Yazd, Iran,
4. Biology Department, Payam Noor University, Tehran, Iran.
(Received: January 8, 2022 - Accepted: May 5, 2022)

ABSTRACT

Regulation of ionic homeostasis in plant cells is one of the important aspects in salt tolerance. In this study, the effect of 200 mM salinity stress after 1, 10 and 20 days of stress on some morphological characteristics, elements concentration and expression of some genes involved in salt tolerance of bread wheat genotypes, including lines 7 and 8 (salt-tolerant), line 16 (salt-sensitive) and Sistan cultivar (native tolerant cultivar) were studied factorially in a Completely Randomized Design (CRD) with three replications. The results showed that salinity stress reduced shoot biomass in all tolerant and sensitive lines with the lowest reduction in line 7. Under salt stress conditions, Na⁺ content had an increasing trend in all lines and K⁺ content had a decreasing trend. The lowest increase of Na⁺, and the lowest decrease of K⁺ and K⁺/Na⁺ ratio was observed in line 7. Under salt stress conditions, the highest expression of *SOS1*, *SOS2* and *SOS3* genes was observed in line 7 and the lowest expression was observed in lines 16 and 8. The results of this study suggest that line 7 had a higher degree of tolerance and can be considered in breeding programs as well as for additional studies in saline areas.

Keywords: K⁺, Na⁺, real time PCR, salt tolerance, wheat.

پاسخ‌های فیزیولوژیکی و الگوی بیان ژن‌های *SOS* گندم نان به تنش شوری

کبری مکاریان^۱، رضا معالی امیری^۲، سید علی پیغمبری^۲، محمد تقی طباطبایی^۳، فاطمه دانشمند^۴

۱-۲- به ترتیب دانش‌آموخته دکتری و استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، کرج،

۳-استادیار، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی یزد، ۴-استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور تهران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱)

چکیده

تنظیم هموستازی یونی در سلول‌های گیاهی یکی از جنبه‌های مهم فیزیولوژی سلول‌های زنده در تحمل به تنش شوری است که توسط مسیر سیگنالینگ فوق حساسیت به شوری (*SOS*) انجام می‌شود. در این پژوهش برخی خصوصیات مورفولوژیک، غلظت عناصر و بیان برخی ژن‌های دخیل در تحمل تنش شوری ۲۰۰ میلی‌مولار پس از یک، ۱۰ و ۲۰ روز از تنش ژنوتیپ‌های گندم نان شامل لاین‌های ۷ و ۸ (متحمل به شوری)، لاین ۱۶ (حساس به شوری) و رقم سیستان (رقم بومی و متحمل) به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار بررسی شد. نتایج نشان داد که تنش شوری باعث کاهش زیست‌توده اندام هوایی در کلیه لاین‌های متحمل و حساس شد که کمترین میزان کاهش معنی‌دار مربوط به لاین ۷ بود. در شرایط تنش شوری در کلیه لاین‌ها میزان Na⁺ روند افزایشی و میزان K⁺ روند کاهشی داشت. کمترین افزایش Na⁺، کمترین کاهش K⁺ و کمترین کاهش نسبت K⁺/Na⁺ در لاین ۷ مشاهده شد. تحت تنش شوری بیشترین میزان بیان ژن‌های *SOS1*، *SOS2* و *SOS3* در لاین ۷ و کمترین میزان بیان در لاین‌های ۱۶ و ۸ مشاهده شد. نتایج این پژوهش پیشنهاد می‌کند که لاین ۷ از درجه تحمل بالاتری برخوردار بوده و می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی و نیز جهت مطالعات تکمیلی در مناطق شور مورد توجه قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: تحمل شوری، K⁺، Na⁺، گندم، Real Time PCR

مقدمه

شوری خاک، یکی از مهم ترین تنش های غیر زیستی است که تولید محصولات کشاورزی را در بسیاری از نقاط جهان محدود می کند. علت اصلی تراکم نمک در نیم رخ خاک در مناطق خشک و نیمه خشک، کیفیت آب آبیاری و یا کمبود آن است. مواردی نیز نشان می دهد که شوری خاک در نتیجه ویژگی های سنگ های مادری است (Pazira & Homae, 2010). در اراضی کشاورزی این مشکل در اثر استفاده از کودهای محلول، آبیاری شدید و بالا آمدن سطح آب های زیرزمینی، شدت یافته است (Rengasamy, 2010; Jan et al., 2017). تخمین زده شده است که حدود ۲۰ درصد زمین های کشاورزی شور هستند (Long et al., 2013). در ایران حدود ۲۰ درصد از اراضی کشور (حدود ۳۴ میلیون هکتار) تحت تاثیر شوری قرار دارد که ۸/۵ میلیون هکتار آن شدیداً تحت تاثیر شوری است (Ranjbar et al., 2016). افزایش شوری خاک، رشد محصولات زراعی را تحت تاثیر قرار داده، پنجه زنی را کاهش و میزان تولید را محدود می کند. اصلاح گیاهان متحمل به شوری، یکی از موثرترین راهکار برای بهبود عملکرد محصول در نواحی شور است (Zhu et al., 2006). گندم نان (*Triticum aestivum* L.) از نظر اهمیت و میزان تولید، اولین غله دنیاست و در کشورهای مختلف جهان به ویژه کشورهای در حال توسعه منبع اصلی تامین کننده کالری انسان است. ارزش غذایی بالا، هضم آسان، تنوع و مرغوبیت فرآورده های آن، سهولت تبدیل، نگهداری و سایر ویژگی ها، گندم را در میان سایر غلات متمایز کرده است (Pask et al., 2014).

در اکثر مناطق خشک جهان که راهکاری جز آبیاری با آب شور برای تولید محصولات زراعی وجود ندارد، شور شدن خاک غیر قابل اجتناب بوده و متأسفانه به تدریج به یک

مشکل عمده به ویژه در مناطق خشک و نیمه خشک ایران تبدیل شده است. اگرچه تنش شوری در تمام مراحل رشدی گیاه می تواند رخ دهد؛ اما با توجه به اینکه شرایط استقرار اولیه و بقای گیاه در عملکرد نهایی تاثیر زیادی دارد، لذا تنش شوری در مرحله گیاهچه ای می تواند برای گیاه بسیار مضر باشد (Ghorbani et al., 2019; Ramadoss et al., 2013). اثرات مخرب تنش شوری، به دلیل کاهش پتانسیل اسمزی در محیط ریشه و تاثیر بر تعادل آبی گیاه و کاهش فشار آماس، در مراحل مختلف رشدی گندم نان توسط پژوهشگران زیادی گزارش شده است (Zhu et al., 2016).

از مهم ترین مکانیسم های مقاومت، کنترل تعادل در جذب Na^+ از ریشه، تنظیم جریان آن در داخل سلول و کنترل انتقال طولانی مسیر آن و همچنین کده بندی^۱ آن در سلول و بافت ها است (Flowers & Colmer, 2008)؛ به طوری که ارقام متحمل کم ترین میزان Na^+ را در بافت های خود نشان می دهند. جذب انتخابی پتاسیم در برابر Na^+ یک مکانیسم فیزیولوژیکی فوق العاده مهم برای مقابله با تجمع شوری در بسیاری از گونه های گیاهی است (Zeeshan et al., 2020). گزارش های زیادی مبنی بر تحمل بیشتر گیاه در ارتباط با سیستم مطلوب تر جذب انتخابی K^+ به Na^+ وجود دارد. در این ارتباط Zeeshan et al. (2020) گزارش کردند که ارقام جو و گندم متحمل به شوری، سطح پایین تری از Na^+ را نسبت به ارقام حساس به شوری در بافت ها نگه می دارند. مشاهده شده که در شرایط غیر تنش نسبت K^+ به Na^+ بالا بوده؛ اما در شرایط تنش مقدار آن کاهش می یابد. در شوری بالا، یون Na^+ با سایر یون ها به ویژه K^+ رقابت می کند و منجر به کاهش K^+ در گیاه می شود (Parida & Das, 2005). نسبت K^+/Na^+ در طی تنش

^۱. Compartmentalization

گندم نان (*TaSOS1*) (Xu et al., 2008)، نی (*PhaNHA1-u*) *Phragmites australis* (Takahashia et al., 2009) و همچنین گیاهان متحمل به شوری نظیر *Thellungiella halophila* (*ThSOS1*) (Oh et al., 2007)، *Cymodocea nodosa* (*CnSOS1A*) و *CnSOS1B* (Garciadebla et al., 2007) شناسایی شده است (Ghasemi et al., 2015). Sathee et al. (2015) بررسی تاثیر تنش شوری بر بیان ژنهای *SOS1*، *SOS2* و *SOS3* در سه رقم متحمل، نیمه متحمل و حساس نشان دادند که بیان ژنهای *SOS1* و *SOS2* در ژنوتیپ متحمل در شرایط تنش شوری افزایش یافته در حالی که در ژنوتیپ نیمه متحمل و حساس این افزایش به ترتیب به میزان کمتری بود. هدف از انجام این تحقیق شناسایی برخی مکانیسم‌های تحمل به تنش شوری بر اساس تجمع میزان K^+ و Na^+ در بافت و بیان ژنهای *SOS* دخیل در این مسیر بود.

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی اثر تنش شوری در زمان‌های مختلف بر خصوصیات مورفولوژیک، غلظت عناصر و بیان برخی ژن‌های مسیر تنش شوری آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور شامل تنش شوری ۲۰۰ میلی‌مولار در زمان‌های صفر، یک، ۱۰ و ۲۰ روز پس از اعمال تنش و چهار ژنوتیپ لاین ۷، لاین ۸، لاین ۱۶ و سیستان (جدول ۱) در سه تکرار در گلخانه مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان یزد انجام شد. انتخاب ژنوتیپ‌ها بر اساس نتایج آزمایش‌های قبلی مزرعه‌ای بود (Mokarian et al., 2021). بذور در گلدان‌هایی با قطر ۱۵ سانتی‌متر حاوی ورمی‌کولیت و خاک مزرعه (به نسبت ۱:۱) کشت شد و تا مرحله سبز شدن کامل گیاهچه‌ها، آبیاری با آب مقطر انجام شد. پس از آن

شوری کاهش می‌یابد و این کاهش در گونه‌های حساس به شوری بیشتر است (Sairam et al., 2002; Zeeshan et al., 2020). تغییر در بیان ژن‌ها از مهمترین رویدادهایی است که در سلول‌های گیاهی تحت تنش رخ داده و منجر به پاسخ‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی در برابر تنش می‌شود. بررسی بیان و نحوه تنظیم ژن‌ها یکی از ابزارهای مهم در اصلاح مقاومت به تنش در گیاهان است (Yousefi Rad et al., 2019). بررسی بیان ژن‌ها با استفاده از روش Real-time PCR به دلیل تکرارپذیری، حساسیت و اختصاصی بودن امروزه کاربرد فراوانی در مطالعات زیستی یافته است (Mohammadi Purfard et al., 2017).

تنظیم هموستازی یونی درون سلول یکی از جنبه‌های مهم فیزیولوژی سلول‌های زنده در تحمل به تنش شوری محسوب می‌شود که توسط مسیر سیگنالینگ فوق حساسیت به شوری (*SOS1*) انجام می‌شود (Tounsi et al., 2017). این مسیر بیوشیمیایی شامل سه ژن اصلی *SOS1*، *SOS2*، *SOS3* می‌باشد. ژن *SOS3* یکی از ژن‌های کلیدی در این مسیر تنظیمی بوده که باعث فعال‌سازی این مسیر می‌شود (Tiwari et al., 2020). در مسیر *SOS* پروتئین متصل‌شونده به کلسیم یا *SOS3* سیگنال تنش شوری را دریافت و منتقل می‌کند. *SOS3* پروتئین *SOS2* را فعال کرده و به سمت غشای پلاسمایی هدایت می‌کند تا فسفریلاسیون پروتئین *SOS1* توسط مجموعه *SOS2-SOS3* فراهم شود. ژن *SOS1* کدکننده یک آنتی‌پورتر پروتون/سدیم واقع در غشای پلاسمایی است که نقش مهمی را در انتقال Na^+ به نواحی آپوپلاست سلول و یا انتقال Na^+ از ریشه به اندام هوایی از طریق سیستم آوندی ایفا می‌کند (Qiu et al., 2002; Li et al., 2020). ژن *SOS1* از گیاهان حساس به شوری نظیر برنج (*OsSOS1* و *OsNHA1*) (Zhou et al., 2016)،

تا رسیدن گیاهان به مرحله سه برگی، گیاهچه ها با محلول هوگلند آبیاری و سپس جهت اعمال تنش شوری نمک NaCl در غلظت مورد نظر به محلول هوگلند اضافه شد. شرایط کنترل شده جهت رشد مطلوب گیاهچه ها شامل آبیاری صحیح و به موقع، دمای مناسب رشد ۲۵- ۱۸ درجه سانتی گراد و شدت نور ۳۰۰ میکرومول بر متر مربع بر ثانیه با ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی فراهم شد.

جدول ۱- ژنوتیپ های گندم مورد استفاده در این آزمایش
Table 1. Genotypes of wheat used in this study

Pedigree	Genotype	NO
Sistan	MS-97-2	-
Sakha & Darab # 2//1-66-22/3/Berkut	MS-97-7	7
Sakha & Darab # 2//1-66-22/5/Seri*3//RL6010/4*YR/3/Pastor/4/Bav92	MS-97-8	8
S-95-16	MS-97-16	16

اندازه گیری غلظت Na^+ و K^+ از دستگاه فلیم فتومتر استفاده شد (Zeeshan et al., 2020).

استخراج RNA با استفاده از بافر تریزول انجام شد. برای ساخت cDNA از کیت RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis K1622 شرکت فرمنتاز و براساس دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. غلظت RNA پس از هر استخراج، با استفاده از دستگاه نانودراپ و در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر تعیین شد. مقدار کل RNA بر حسب میکروگرم در میکرولیتر محاسبه شد. در مرحله بعد RNA استخراج شده با آنزیم DNase I براساس روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز تیمار شد. دو میکروگرم RNA، یک میکرولیتر بافر، یک واحد (u) آنزیم DNase I و ۱۰ واحد (u) آنزیم RNase inhibitor، مخلوط و با افزودن آب DEPC حجم محلول به ۱۰ میکرولیتر رسانده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. سپس یک میکرولیتر EDTA به تیوبها اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. تیوبها در ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. به منظور ساخت cDNA، پنج میکرولیتر RNA تیمار شده با DNase با کمک آغازگر الیگودی تی

برای حفظ شرایط نرمال رشد و جلوگیری از اعمال ناگهانی تنش، گیاهان به تدریج در معرض تیمار محلول نمک قرار گرفتند. در چند روز اول آبیاری با آب شور محتوی غلظت کم نمک با ۵۰ میلی مولار شروع شد و سپس به مدت هفت روز تا حد پیش بینی شده افزایش یافت. در هر نوبت آبیاری آبی که به هر گلدان اضافه می شد براساس ظرفیت زراعی بود. برای اطمینان از جلوگیری از خروج آب از گلدان از زیرگلدانی استفاده شد. از طرف دیگر هر سه روز یکبار EC عصاره اشباع خاک در گلدان های آزمایش به همراه هدایت الکتریکی آب خارج شده از گلدانها اندازه گیری می شد.

پس از اجرای آزمایش و اعمال تنش شوری در زمان های مربوطه پس از اعمال تنش، گلدانها تخریب و نمونه کافی از بافت برگ جهت اندازه گیری عناصر Na^+ ، K^+ و بیان ژن های *SOS1*، *SOS2* و *SOS3* تهیه شد. نمونه ها در داخل فویل پیچیده و پس از قرارگیری در نیتروژن مایع بلافاصله به فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد منتقل شدند. اندازه گیری عناصر در نمونه های گیاهی به روش خاکستر کردن خشک و ترکیب با HCl انجام شد (Zeeshan et al., 2020).

از مخلوط کردن به مدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس برای غیر فعال کردن واکنش، تیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. پس از ساخت cDNA، به منظور نگهداری، نمونه‌ها به فریزر -۲۰ درجه سانتی‌گراد منتقل و برای اطمینان از ساخت cDNA با استفاده از ژن مرجع اکتین واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز روی cDNA ساخته شده انجام شد. طراحی آغازگرها با برنامه آنالین Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>) انجام شد (جدول ۲).

(یک پیکومول) (۲۰-۱۸ نوکلئوتید) مخلوط و حجم محلول با استفاده از آب DEPC به ۱۱ میکرولیتر رسانده شد. این مخلوط به مدت پنج دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت و سپس روی یخ سرد شد. در ادامه چهار میکرولیتر بافر واکنش و دو میکرولیتر دی‌اکسی-نوکلئوتری فسفات (dNTPs) با غلظت ۱۰ میکرومول و ۲۰ واحد آنزیم *RNase inhibitor* به هر تیوب اضافه و حجم محلول با آب DEPC به ۱۹ میکرولیتر رسانده شد. سپس تیوب‌ها به مدت پنج دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. بعد از آن ۲۰۰ واحد (u) آنزیم Revert Aid M-Mulv به این محلول افزوده و پس

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای استفاده شده در این تحقیق
Table 2. Property of primers used in this study.

Accession no	Gene	Sequence (5'-3')	T _m (°C)	PCR Product size (bp)
AY326952.3	<i>SOS1</i>	CGGTAGGAGAAGATGACGAC GAGGGTGGATTGAACGAAAG	60	106
JQ066737.1	<i>SOS2</i>	GCTTGAAGAAAGTGAGTCTCG GCTACATAGTTCGGAGTTCACACA	60	113
JF263455.1	<i>SOS3</i>	CGCCTGAATCGGACAAGACC CGAGGAGTGCCACCACCATC	60	105
AB181991.1	<i>Actin</i>	GTGTACCCTCAGAGGAATAAGG GTACCACACAATGTCGCCTTAGG	60	152

میکرومول، سه میکرولیتر آب مقطر استریل و پنج میکرولیتر نمونه cDNA استفاده شد. برای هر واکنش (تکرار بیولوژیکی) سه تکرار در نظر گرفته شد. پس از آماده کردن مخلوط واکنش، پلیت مورد نظر به دستگاه iQ5 منتقل و با شرایط زیر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز انجام شد: دو دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و ۳۵ تکرار با چرخه‌های ۱۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۱۰ ثانیه در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد

تمامی نکات مربوط به طراحی آغازگر از قبیل درصد GC بالای ۵۰ درصد و حضور G و یا C در انتهای 3' آغازگرها، دمای اتصال ۶۰ درجه و طراحی آغازگر از ناحیه 3' ژن مورد توجه قرار گرفت. در این تحقیق از دستگاه iQ5 شرکت بایورد^۱ و کیت حاوی رنگ فلورسنت SYBR BioPars برای ارزیابی کمی استفاده شد. ۲۰ میکرولیتر مخلوط واکنش PCR شامل ۱۰ میکرولیتر مخلوط SYBR BioPars، یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای اختصاصی پیشرو و پسرو با غلظت ۱۰

^۱. BioRad

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس اختلاف معنی داری بین ژنوتیپها و زمان شوری و اثر متقابل آنها در صفات مطالعه شده نشان داد (جدول ۳).

بر اساس نتایج، میانگین وزن خشک اندام هوایی در شرایط تنش نسبت به شرایط شاهد (بدون تنش) کاهش معنی داری داشت و بیشترین کاهش در لاین ۱۶ و کمترین کاهش مربوط به لاین ۷ بود. وزن خشک اندام هوایی از آغاز تنش تا بیست روز پس از تنش حدود ۵۰ درصد کاهش یافت (شکل ۱).

(دمای Tm آغازگر) و ۱۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی-گراد. بیان نسبی ژن ها با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد (Pfaffl, 2007). جهت تجزیه داده ها از نرم افزار REST^۱ استفاده شد (Pfaffl et al., 2002).

این پژوهش به صورت آزمایش فاکتوریل (دو فاکتوری) و در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد. برای تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزار SAS 9.2 و به منظور انجام مقایسات میانگین از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد و برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده شد.

جدول ۳- تجزیه واریانس صفات اندازه گیری شده در گندم تحت تنش شوری

Table 3. Analysis of variance in wheat genotypes under salt stress conditions

S.O. V	df	Shoot dry weight	Na ⁺	K ⁺	K ⁺ /Na ⁺
Genotype	3	0.079**	30.153**	99.233**	15.882**
Salt	3	10.513**	104.412**	201.935**	235.704**
Salt×Genotype	9	0.055*	4.171**	7.391**	2.077**
Residual	32	0.019	0.173	1.377	0.387
C.V. (%)		12.65	6.56	4.58	10.82

^{ns}, * و ** به ترتیب عدم اختلاف معنی دار و معنی داری در سطوح احتمال پنج و یک درصد.

^{ns}, * and **: non-significant difference and significant differences at 5 and 1% probability levels, respectively.

۷ کمترین میزان (۲/۴۶ برابر) و در لاین ۱۶ بیشترین میزان (۴/۶۳ برابر) را به خود اختصاص داد (شکل ۲- الف). یکی از مهم ترین زمینه های مقاومت، تنظیم تعادل در جذب Na⁺ از ریشه، تنظیم جریان آن در داخل سلول، کنترل انتقال طولانی مسیر آن و همچنین کده بندی آن در سلول و بافتها است (Flowers & Colmer, 2008). دفع Na⁺ از اندام های هوایی به عنوان یکی از مکانیسم های مهم تحمل شوری در برخی از گیاهان از جمله گندم شناسایی شده و تحمل به شوری در این گونه ها به توانایی آنها برای دفع Na⁺ وابسته بوده به طوری که از تجمع

تحت شرایط شاهد (بدون تنش) میزان Na⁺ اندام هوایی در کلیه ژنوتیپها اختلاف معنی داری نشان نداد اما در شرایط تنش شوری با گذشت زمان بر میزان Na⁺ اندام هوایی همه ژنوتیپها افزوده شد. مقایسه میزان Na⁺ در ده روز پس از تنش تفاوت معنی داری در لاین های مختلف نشان نداد که حاکی از آن است که در تنش کوتاه مدت احتمالاً همه ژنوتیپها ظرفیت سلولی مشابهی در عدم جذب یا دفع Na⁺ و تحمل شوری داشتند. باین وجود با گذشت زمان این تفاوت در ژنوتیپها آشکار شد به طوری که در تنش طولانی مدت، این افزایش به ترتیب در لاین

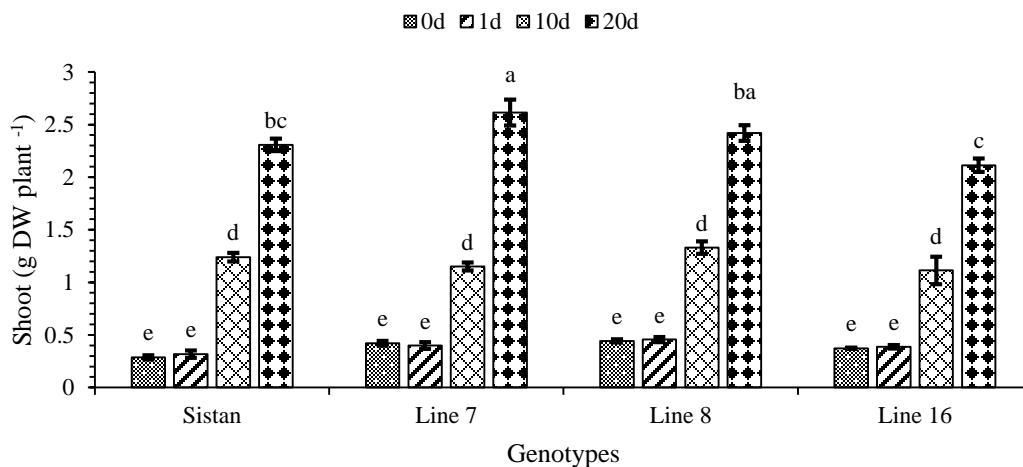
^۱. Relative expression software tool

لاین ۱۶ و ۷ بیشترین (۱/۷۲ برابر) و کمترین (۱/۱۸ برابر) کاهش مشاهده شد اگرچه روند کاهشی در لاین ۷ (متحمل) در زمان ده روز پس از تنش متوقف شد (شکل ۲-ب).

جذب انتخابی K^+ در برابر Na^+ یک مکانیسم فیزیولوژیکی مهم برای مقابله با تجمع شوری در بسیاری از گونه‌های گیاهی است (Aly *et al.*, 2018). تنظیم هموستازی یون-ها در گیاه، برای تحمل گیاه و حفظ حالت پایداری در سلول‌های گیاهی در برابر تنش شوری لازم است. *et al.* Iqra (2020) نشان دادند که شوری تجمع K^+ را در ارقام متحمل به نمک تحریک کرده در حالی که این پاسخ در ارقام نیمه‌حساس و حساس برعکس بود. بنابراین با توجه به تجمع بیشتر K^+ در زمان تنش، لاین ۷ تحمل مطلوبتری در مقایسه با سایر لاین‌های مطالعه شده دارد.

غلظت‌های بالای یون Na^+ در برگ به ویژه پهنک برگ جلوگیری می‌کند (Hasanuzzaman *et al.*, 2017). از آنجایی که تحمل شوری در گندم و بسیاری از تک‌لپه‌ای‌ها همبستگی بالایی با غلظت پایین Na^+ اندام هوایی دارد (Colmer *et al.*, 2005) به نظر می‌رسد که لاین ۷ احتمالاً میزان بالاتری Na^+ دفع و یا در واکنش خود ذخیره کرده و پاسخ‌های تحمل مطلوبتری داشته است.

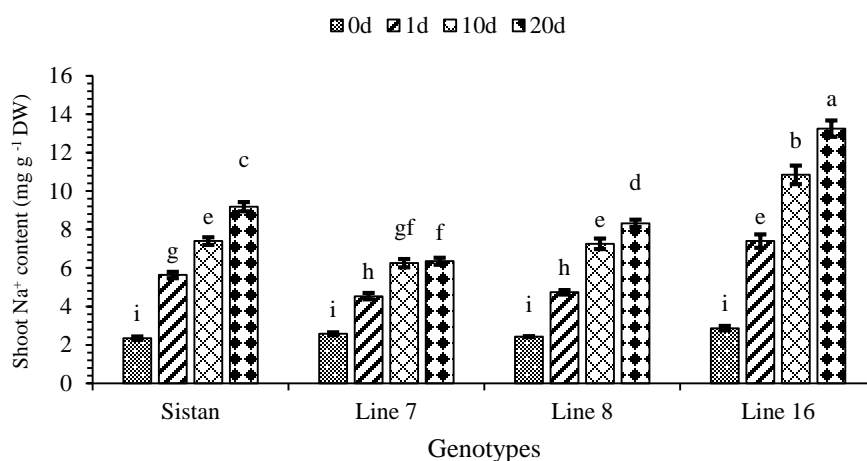
تحمل شوری گیاه نه تنها با میزان Na^+ اندام هوایی تعیین می‌شود بلکه به توانایی حفظ میزان بالای K^+ درون سلول نیز بستگی دارد (Shabala & cuin; 2008;). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که در شرایط شاهد تغییری در میزان K^+ مشاهده نشد اما در شرایط تنش شوری با گذشت زمان از میزان K^+ اندام هوایی کاسته شد به طوری که بیست روز پس از تنش در



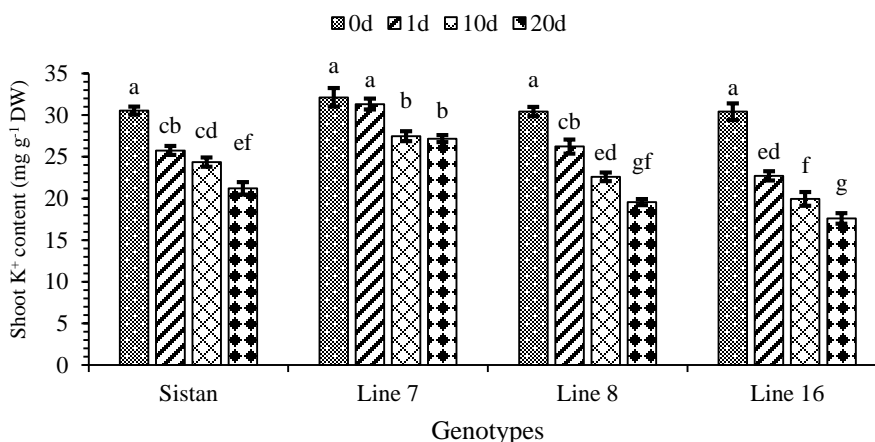
شکل ۱- الگوی تغییر وزن خشک اندام هوایی ژنوتیپ‌های گندم پس از یک، ۱۰ و ۲۰ روز تنش شوری ۲۰۰ میلی‌مولار

Figure 1. Pattern of shoot dry weight changes of wheat genotypes after one, 10 and 20 days of 200 mM salinity stress

الف



ب



شکل ۲- الگوی تغییر میزان Na^+ (الف) و K^+ (ب) اندام هوایی ژنوتیپ های گندم پس از یک، ده و بیست روز تنش شوری ۲۰۰ میلی-مولار. ستون های دارای حداقل یک حرف مشترک، اختلاف معنی داری بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

Figure 2. Pattern of Na^+ and K^+ shoot changes in wheat genotypes after one, 10 and 20 days of 200 mM salinity stress. Columns with at least one letter in common did not have a statistically significant difference based on the Duncan test at 5%)

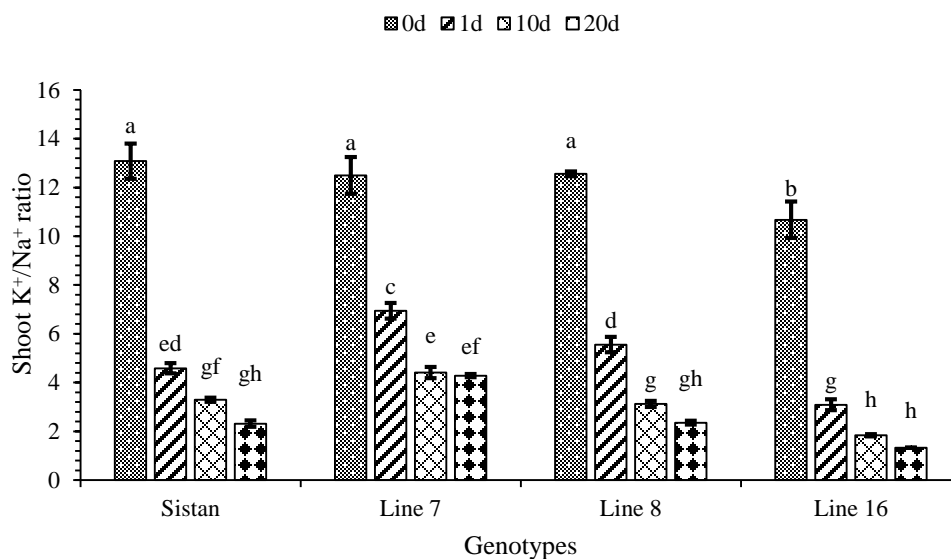
بیشترین کاهش نسبت K^+/Na^+ را لاین ۱۶ به خود اختصاص داد (۱/۰۱ برابر) (شکل ۳). بنابراین تحت تنش شوری، یون Na^+ با سایر یون ها به ویژه K^+ در تقابل بوده و منجر به کاهش K^+ در گیاه می شود (Zeeshan *et al.*, 2020).

بیشترین افزایش در میزان Na^+ و کمترین میزان K^+ مربوط به لاین ۱۶ بوده که قابل مقایسه با مقادیر مشابه

گزارش ها نشان داده که در شرایط شاهد نسبت K^+ به Na^+ بالا بوده اما در شرایط تنش شوری مقدار آن رو به کاهش رفت. در شوری بالا، یون Na^+ با سایر یون ها به ویژه K^+ رقابت می کند (Zeeshan *et al.*, 2020). در تحقیق حاضر نیز نسبت K^+/Na^+ اندام هوایی در شرایط تنش شوری کاسته شد. کمترین میزان کاهش در لاین ۷ (۲/۹۲ برابر) بوده که در زمان ده روز پس از تنش متوقف شد و

نسبت کمترین کاهش (۲/۹۲ برابر) را در مقایسه با دیگر ژنوتیپ‌ها داشت. مطالعات نشان داده که ارقام متحمل پاسخ‌های اولیه و دیر هنگام مطلوب‌تری به تنش نشان می‌دهند در حالی که ارقام حساس تنها پاسخ‌های اولیه موقت دارند و سریعاً در اثر تنش از بین می‌روند (Heidarivand & Maali Amiri, 2013). پاسخ‌های زود هنگام مربوط به ساعات پس از تنش تا یک روز پس از تنش بوده در حالی که پاسخ‌های دیر هنگام مربوط به زمان‌های طولانی‌تر یعنی چند روز پس از زمان شروع تنش می‌باشد (Rakei et al., 2016).

در لاین ۷ می‌باشد. بنابراین به نظر می‌رسد لاین ۷ با کمترین تجمع Na^+ در برگ و بیشترین میزان K^+ وضعیت تعادل یونی مطلوبی را جهت رشد اولیه در خود ایجاد کرده و بیانگر فتوسنتز مطلوب احتمالی در آن می‌باشد. بیشترین میزان وزن خشک اندام هوایی تحت تنش تایید کننده این موضوع است (شکل ۱). نکته جالب‌تر آن که لاین ۷ پاسخ‌های دیر هنگام مطلوب‌تری به تنش شوری در مقایسه با دیگر ژنوتیپ‌ها نشان داد. تحت شرایط یک روز پس از تنش، کمترین کاهش در K^+/Na^+ به لاین ۷ اختصاص یافته (۱/۸ برابر) و ۲۰ روز پس از تنش نیز این



شکل ۳- الگوی تغییر نسبت K^+ به Na^+ اندام هوایی ژنوتیپ‌های گندم پس از یک، ۱۰ و ۲۰ روز تنش شوری ۲۰۰ میلی‌مولار. ستون‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، اختلاف معنی‌داری بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

Figure 3. Pattern of change in ratio of K^+ to Na^+ shoots of wheat genotypes after one, 10 and 20 days of salinity stress of 200 mM. Columns with at least one letter in common did not have a statistically significant difference based on the Duncan test at 5%.

بیشترین افزایش (۵/۹۹ برابر) مشاهده شد. همچنین در لاین ۸ و ۱۶ در شرایط تنش شوری با گذشت زمان ابتدا افزایش و سپس کاهش میزان بیان این ژن مشاهده شد. روند تغییر سطوح بیان ژن *SOS3* در ژنوتیپ های استفاده شده تقریباً مشابه با ژن *SOS2* بود که بیانگر آن است که پروتئین *SOS3* پس از فعال شدن و اتصال به *SOS2* باعث دایمر شدن و در نتیجه افزایش فعالیت *SOS2* می شود. تطابق بالای الگوی بیان دو ژن *SOS1* و *SOS2* موید نوعی ارتباط ساختاری این دو پروتئین و نقش مکمل آن ها در تحمل تنش شوری می باشد. *SOS2* در مسیر درک تنش شوری و پاسخ به آن قرار داشته و باعث القای بیان برخی از ژن ها از جمله *SOS1* می شود (Feki et al., 2011)، همچنین این پروتئین کیناز ممکن است با فعال کردن پروتئین های غشای پلاسمایی و واکوئلی مانند ATPase H- و AVP، با تامین شیب پروتون، به طور غیر مستقیم بیان و فعالیت آنتی پورترهای غشایی Na^+/H^+ از جمله *SOS1* و *NHX1* را در ریشه گیاهچه های گندم افزایش دهد. بدین ترتیب Na^+ وارد شده به داخل سلول، از آن خارج و یا در واکوئل سلولی، کده بندی می شود (Ben Amar et al., 2014). تحت تنش شوری افزایش القای بیان ژن *SOS1* در ژنوتیپ ها نسبت به شاهد مشابه *SOS2* و *SOS3* بود به طوری که بیشترین افزایش بیان نسبت به کنترل مربوط به لاین ۷ و بیست روز پس از تنش بود (۷/۴۲ برابر). در واقع افزایش کمپلکس پروتئینی *SOS3/SOS2* باعث فسفریله شدن و فعالیت بیشتر آنتی پورتر $(SOS1)Na^+/H^+$ واقع در غشای پلاسمایی سلول می شود. بنابراین فعال شدن *SOS1* موجب خارج شدن Na^+ از سیتوپلاسم به محیط آپوپلاست شده و به ایجاد تعادل اسمزی در داخل سلول می انجامد (Shi et al., 2002; Hasegawa, 2013). مقایسه الگوی

در گیاهان، تنظیم تعادل یونی تحت تنش شوری اغلب تحت کنترل بیان ژن های تولیدکننده پروتئین هایی است که در غشاهای پلاسمایی و اجزای سلولی از جمله اندامک ها فعالیت می کنند (Suo et al., 2017). بنابراین ارزیابی بیان نسبی این ژن ها از جمله پورترهای دخیل در نقل و انتقال سدیم تحت تنش اطلاعات مفیدی ارائه می کند. با توجه به اینکه روند تغییر الگوی صفات مرتبط با تعادل یونی در ژنوتیپ متحمل در روزهای دهم و بیستم مشابه (عدم تغییر معنی دار) یکدیگر بوده، لذا در جهت بررسی الگوی بیان ژن های دخیل در تنظیم تعادل یونی، تنها تیمارهای زمانی ده روز پس از تنش شوری در مقایسه با روز اول و شرایط شاهد ارزیابی شد (جدول ۴).

نتایج نشان داد بعد از اعمال تنش شوری سطوح بیان *SOS3* در لاین ۷ به طور مداوم در مقایسه با شرایط شاهد افزایش یافت و در بیست روز پس از تنش به حداکثر مقدار خود (۲/۷۴ برابر) رسید. در حالی که در سایر ژنوتیپ ها روند نامنظمی در طول زمان تنش مشاهده شد به طوری که به جز لاین ۷، در سایر ژنوتیپ ها میزان بیان این ژن بیست روز پس از تنش به شدت کاهش یافت و بیشترین کاهش در لاین ۱۶ (۳/۱۵- برابر) بود. به نظر می رسد با افزایش شدت تنش فرایند رونویسی این ژن دچار خسارت شده و بنابراین به دلیل عدم فعالیت مطلوب آنتی پورتر *SOS1* انتظار خسارت شدید در سلول قابل پیش بینی خواهد بود. کاهش معنی دار میزان وزن خشک و پتاسیم اندام هوایی و همچنین بیشترین تجمع سدیم در سیستان و لاین ۱۶ تاییدکننده چنین پاسخ سلولی در سطح رونوشت می باشد. بیان نسبی ژن *SOS2* نیز در شرایط تنش شوری افزایش نشان داد. بر اساس نتایج، بیان نسبی ژن *SOS2* لاین ۱۶ در شرایط تنش شوری با گذشت زمان، کمترین افزایش را داشت (۲/۸۹ برابر) ولی در لاین ۷

کاهش یافت ولی در ژنوتیپ وحشی این افزایش به ترتیب به میزان کمتری بود. بیان بالای هم‌زمان ژن‌های *SOS1*، *SOS2* و *SOS3* در نمونه اندام هوایی لاین متحمل به شوری تحت تنش طولانی مدت در شکل ۴ نشان می‌دهد که بیان ژن *SOS1* تحت تنش شوری با مسیر تنظیمی *SOS3/SOS2* تنظیم می‌شود. بیان نسبی ژن *SOS3* در شرایط تنش شوری در لاین ۷ با گذشت زمان افزایش یافته و لیکن در سه لاین دیگر ابتدا افزایشی و سپس کاهش می‌یابد (شکل ۴). بنابراین ژنوتیپ متحمل به شوری (لاین ۷) توانایی بیشتری در بیان ژن‌های مربوط به پاسخ‌های فیزیولوژیکی و هموستازی یونی داشته و همچنین توانایی دفع Na^+ بیشتری از درون سلول داشت. در نتیجه سبب افزایش میزان K^+ و افزایش نسبت Na^+/K^+ در اندام هوایی گیاه می‌شود. چنین فرایندی تحت تنش شوری خسارت کمتری به ژنوتیپ متحمل در مقایسه با ژنوتیپ حساس وارد می‌کند.

بیان ژن *SOS1* و میزان Na^+ در ژنوتیپ‌ها نشان داد که هم‌زمان با افزایش بیان ژن *SOS1*، از میزان تجمع Na^+ دریافت‌ها کاسته شده؛ به همین دلیل به نظر می‌رسد که پروتئین *SOS1* می‌تواند به عنوان مکانیسم پاکسازی Na^+ عمل کرده و پاسخ لاین متحمل ۷ در مقایسه با دیگر ژنوتیپ‌ها از این نظر مطلوب‌تر بود. بیان پایین *SOS1* در لاین ۱۶ بیانگر ظرفیت محدود ژنتیکی این ژنوتیپ در مهار یون Na^+ و حساسیت بالاتر آن به شوری بود. مطالعات زیادی در مورد *SOS3* از جمله بررسی تاثیر بیان هم‌زمان ژن‌های مسیر *SOS* در افزایش تحمل گیاه نسبت به شوری انجام شده است (Xu et al., 2008; Tiwari et al., 2020). Yousefirad et al. (2018) در بررسی تاثیر تنش شوری بر بیان ژن‌های مسیر سیگنالینگ در دو رقم متحمل موتانت و وحشی به این نتیجه رسیدند که بیان ژن *SOS1* در ژنوتیپ موتانت در شرایط تنش شوری با گذشت زمان ابتدا افزایش و سپس

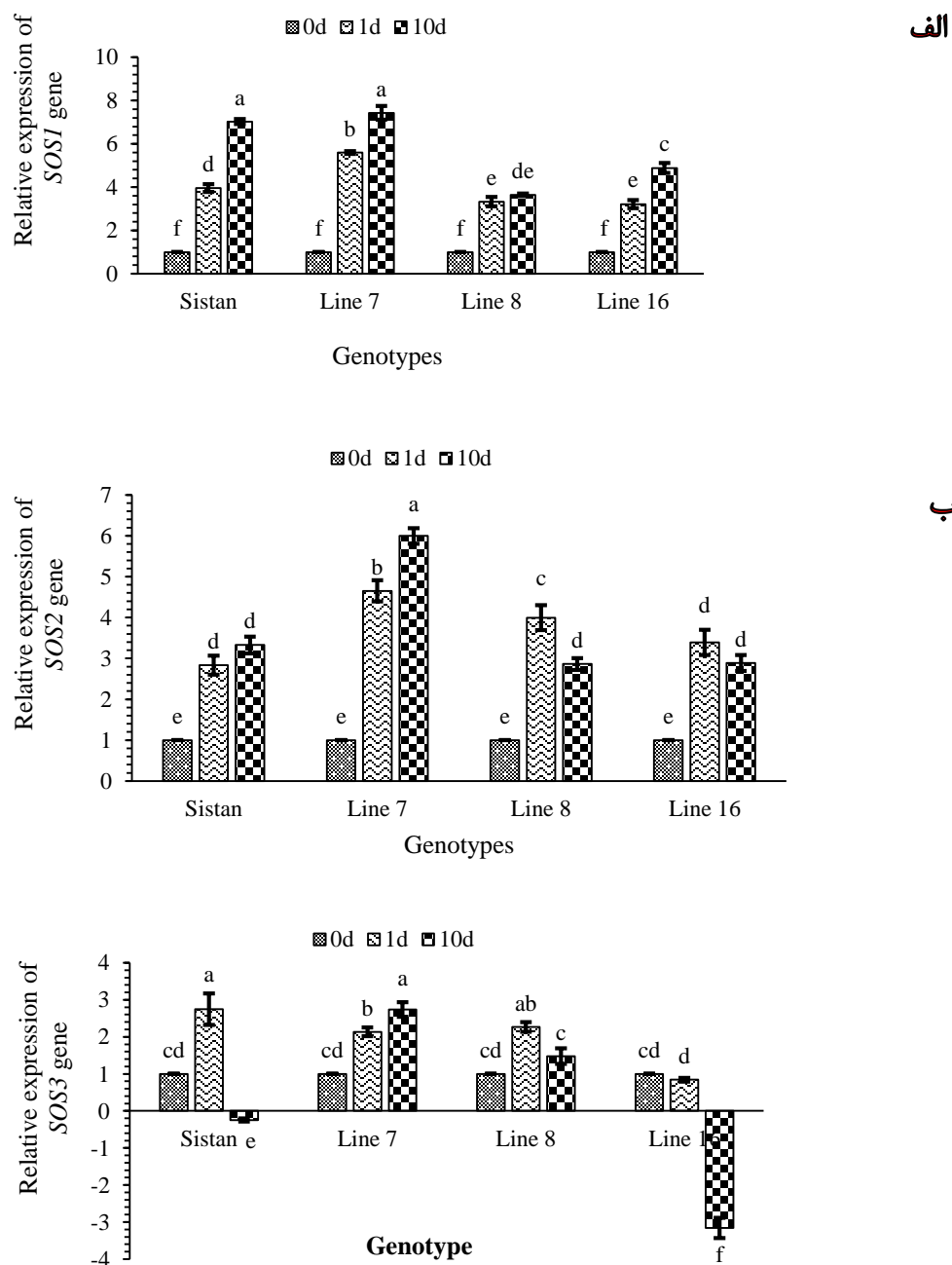
جدول ۴- تجزیه واریانس تاثیر تنش شوری بر بیان برخی ژن‌های مسیر تنش شوری در ژنوتیپ‌های مختلف گندم در زمان‌های مختلف.

Table 4. Analysis of variance expresses the effect of salinity stress some genes of salinity stress pathway in different wheat genotypes at different times.

S.O.V	df	Mean Squares		
		<i>SOS1</i>	<i>SOS2</i>	<i>SOS3</i>
Genotype	3	7.551**	4.540**	10.021**
Salt	2	69.319**	30.122**	9.705**
Salt × Genotype	6	2.839**	2.029**	5.776**
Residual	24	0.072	0.112	0.094
C.V. (%)		7.46	11.82	28.67

** : معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

** : Significantly difference at 1 % probability levels



شکل ۴- الگوی تغییر میزان بیان ژن *SOS1* (الف)، *SOS2* (ب) و *SOS3* (ج) اندام هوایی ژنوتیپ های گندم پس از یک و ده روز تنش شوری ۲۰۰ میلی مولار. ستون هایی دارای حداقل یک حرف مشترک، اختلاف معنی داری بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

Figure 4. Pattern of changes of *SOS1*, *SOS2*, and *SOS3* genes expression in wheat genotypes after one and 10 days of 200 mM salinity. Columns with at least one letter in common did not have a statistically significant difference based on the Duncan test at 5%.

نتیجه‌گیری کلی

بررسی بیان ژن‌های *SOS1*، *SOS2* و *SOS3* نشان داد که لاین ۷ در شرایط تنش شوری بیشترین میزان بیان ژن-های *SOS1*، *SOS2* و *SOS3* را دارا بوده و کمترین میزان بیان ژن‌های فوق در لاین‌های ۱۶ و ۸ مشاهده شد. نتایج این پژوهش پیشنهاد می‌کند لاین ۷ از درجه تحمل بالاتری برخوردار بوده و می‌تواند در شرایط شور، رشد رویشی و احتمالاً عملکرد بالاتری داشته باشد. توصیه می‌شود این لاین در برنامه‌های اصلاحی و نیز جهت کشت در مناطق شور مورد توجه بیشتری قرار گیرد.

شناسایی مسیرهای مولکولی و همچنین مولکول‌های واسط که در انتقال و پردازش تنش در گیاهان نقش دارند بسیار مهم و اساسی است. برهمکنش بین شبکه پیچیده انتقال سیگنال در گیاهان، باعث ظهور تحمل به تنش شوری می‌شود. نتایج نشان داد تنش شوری باعث کاهش بیوماس اندام هوایی در کلیه لاین‌ها شد که کمترین میزان کاهش بیوماس مربوط به لاین ۷ بود. همچنین کمترین افزایش تجمع Na^+ در بافت‌ها، در لاین ۷ مشاهده شد.

REFERENCES

- Aly, A. A., Maraei, R. W., & Ayadi, S. (2018). Some biochemical changes in two Egyptian bread wheat cultivars in response to gamma irradiation and salt stress. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 24(1), 50-59.
- Ben Amar, S., Brini, F., Sentenac, H., Masmoudi, K., & Véry, A. A. (2014). Functional characterization in *Xenopus oocytes* of Na^+ transport systems from durum wheat reveals diversity among two HKT1; 4 transporters. *Journal of Experimental Botany*, 65(1), 213-222.
- Colmer, T. D., Munns, R., & Flowers, T. J. (2005). Improving salt tolerance of wheat and barley: Future prospects. *Australian Journal of Experimental Agricultural*, 45, 1425-1443.
- Feki, K., Quintero, F. J., Pardo, J. M., & Masmoudi, K. H. (2011). Regulation of durum wheat Na^+/H^+ exchanger TdSOS1 by phosphorylation. *Plant Molecular Biology*, 76(6), 545-556.
- Flowers, T. J., & Colmer, T. D. (2008). Salinity tolerance in halophytes. *New Phytologist*, 945-963.
- Garcia-deblás, B., Haro, R., & Benito, B. (2007). Cloning of two SOS1 transporters from the seagrass *Cymodocea nodosa*. SOS1 transporters from *Cymodocea* and *Arabidopsis* mediate potassium uptake in bacteria. *Plant Molecular Biology*, 63(4), 479-490.
- Ghasemi Omran, V.O., A. Bagheri, G.A. Nematzadeh, A. Mirshamsi & Babaiian Jelodar, N.A. (2015). Isolation and expression analysis of *Alsos1* Gene under NaCl stress in halophyte grass *Aeluropus Littoralis* Parl. *Journal of Crop Breeding*, 7(16): 60-69.
- Ghorbani, A., Omran, V. O. G., Razavi, S. M., Pirdashti, H., & Ranjbar, M. (2019). *Piriformospora indica* confers salinity tolerance on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) through amelioration of nutrient accumulation, K^+/Na^+ homeostasis and water status. *Plant Cell Reports*, 38(9), 1151-1163.
- Hasegava, P. M. (2013). Sodium (Na^+) homeostasis and salt tolerance of plants. *Environmental and Experimental Botany*, 92, 19-31.
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Rahman, A., Anee, T. I., Alam, M. U., Bhuiyan, T. F., ... & Fujita, M. (2017). Approaches to enhance salt stress tolerance in wheat. *Wheat Improvement, Management and Utilization*, 151-187.
- Heidarvand, L. & Maali Amiri, R. (2013). Physio-biochemical and proteome analysis of chickpea in early phases of cold stress. *Journal of Plant Physiology*, 170:459-469.
- Iqra, L., Rashid, M. S., Ali, Q., Latif, I., & Mailk, A. (2020). Evaluation for Na^+/K^+ ratio under salt stress condition in wheat. *Life Science Journal*, 17(7), 43-47.
- Jan, A. U., Hadi, F., Nawaz, M. A., & Rahman, K. (2017). Potassium and zinc increase tolerance to salt stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 116, 139-149.
- Li, J., Zhou, H., Zhang, Y., Li, Z., Yang, Y., & Guo, Y. (2020). The GSK3-like kinase BIN2 is a molecular switch between the salt stress response and growth recovery in *Arabidopsis thaliana*. *Developmental Cell*, 55(3), 367-380.

15. Long, N. V., Dolstra, O., Malosetti, M., Kilian, B., Graner, A., Visser, R. G., & van der Linden, C. G. (2013). Association mapping of salt tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 126(9), 2335-2351.
16. Maha, A., Sanaa, Mabrook, I., Amira, Y.M., & Gouda, M. A. (2017). Evaluation of some Egyptian bread wheat (*Triticum aestivum*) cultivars under salinity stress. *Alexandria Science Exchange Journal*, 38(260), 2.
17. Mohammadi Purfard, A., Nouri, M. Z., & Dehestani, A. (2017). Dissection of the molecular mechanism of salinity stress tolerance in halophyte plant, *Aeluropus litoralis* using *ALSOS* genes. *Crop Biotechnology*, 15, 18-24.
18. Mokarian, K., Maali-Amiri, R., Peyghambari, S. A., Tabatabai, S. T., & Daneshmand, F. (2021). Response evaluation to salinity stress in some bread wheat genotypes using tolerance indices. *Iranian Journal of Field Crop Science*, 52(3), 97-111. (In Persian)
19. Oh, D. H., Gong, Q., Ulanov, A., Zhang, Q., Li, Y., Ma, W., ... & Bohnert, H. J. (2007). Sodium stress in the halophyte *Thellungiella halophila* and transcriptional changes in a thsos1-RNA interference line. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49(10), 1484-1496.
20. Parida, A. K., & Das, A. B. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60(3), 324-349.
21. Pask, A., Joshi, A. K., Manès, Y., Sharma, I., Chatrath, R., Singh, G. P., ... & Reynolds, M. P. (2014). A wheat phenotyping network to incorporate physiological traits for climate change in South Asia. *Field Crops Research*, 168, 156-167.
22. Pazira, E., & Homaeae, M. (2010). Salt leaching efficiency of subsurface drainage systems at presence diffusing saline water table boundary: A case study in Khuzestan plains, Iran. *CIGR XVIIIth World Congress*, 13-17 June, Québec city, Canada.
23. Pfaffl, M. W. (2007). Relative quantification in: real-time PCR, Dorak M.T. (ed). Taylor and Francis Group. U.K.
24. Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., & Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30(9): 36-46.
25. Qiu, Q. S., Guo, Y., Dietrich, M. A., Schumaker, K. S., & Zhu, J. K. (2002). Regulation of SOS1, a plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(12), 8436-8441.
26. Rakei, A., Maali-Amiri, R., Zeinali, H. & Ranjbar, M. (2016). DNA methylation and physio-biochemical analysis of chickpea in response to cold stress. *Protoplasma*, 253(1), 61-76.
27. Ranjbar, Gh., Pirasteh-Anosheh, H., Banakr, M. H., & Miri, H. R. (2016). A review on halophytes researches in Iran: explanation of challenges and solutions. *Journal of Plant Ecophysiology*, 32, 117-129.
28. Ramadoss, D., Lakkineni, V. K., Bose, P., Ali, S., & Annapurna, K. (2013). Mitigation of salt stress in wheat seedlings by halotolerant bacteria isolated from saline habitats. *SpringerPlus*, 2(1), 1-7.
29. Rengasamy, P. (2010). Soil processes affecting crop production in salt-affected soils. *Functional Plant Biology*, 37(7), 613-620.
30. Sairam, R. K., Rao, K. V., & Srivastava, G. C. (2002). Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant science*, 163(5), 1037-1046.
31. Sathee, L., Sairam, R. K., Chinnusamy, V., & Jha, S. K. (2015). Differential transcript abundance of salt overly sensitive (SOS) pathway genes is a determinant of salinity stress tolerance of wheat. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37(8), 1-10.
32. Shabala, S. & Cuin, T. A. (2008). Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiologia Plantarum*, 133(4), 651-659.
33. Shi, H., F. J. Quintero, J.M. Pardo & Zhu, J. K. (2002). The putative plasma membrane Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ antiporter SOS1 controls long distance Na⁽⁺⁾ transport in plants. *Plant Cell*, 14, 465-477.
34. Suo, J., Zhao, Q., David, L., Chen, S. & Dai, S. (2017). Salinity response in chloroplasts: Insights from gene characterization. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(5), 1011.
35. Takahashi, R., Liu, S., & Takano, T. (2009). Isolation and characterization of plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter genes from salt-sensitive and salt-tolerant reed plants. *Journal of Plant Physiology*, 166(3), 301-309.

36. Tiwari, B. K., Aquib, A., & Anand, R. (2020). Analysis of physiological traits and expression of *NHX* and *SOS3* genes in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) under salinity stress. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 9, 362-366.
37. Tounsi, S., Feki, K., Hmidi, D., Masmoudi, K., & Brini, F. (2017). Salt stress reveals differential physiological, biochemical and molecular responses in *T. monococcum* and *T. durum* wheat genotypes. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 23(3), 517-528.
38. Xu, H., Jiang, X., Zhan, K., Cheng, X., Chen, X., Pardo, J. M., & Cui, D. (2008). Functional characterization of a wheat plasma membrane Na^+/H^+ antiporter in yeast. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 473(1), 8-15.
39. Yousefirad, S., Soltanloo, H., Ramezanpour, S. S., & Zaynali Nezhad, Kh. (2019). The study of *SOS* genes expression in mutant barley root under salt stress. *Journal of Crop Breeding*, 29, 1-8
40. Yousefirad, S., Soltanloo, H., Ramezanpour, S. S., Zaynalinezhad, K., & Shariati, V. (2018). Salt oversensitivity derived from mutation breeding improves salinity tolerance in barley via ion homeostasis. *Biologia Plantarum*, 62(4), 775-785.
41. Zeeshan, M., Lu, M., Sehar, S., Holford, P., & Wu, F. (2020). Comparison of biochemical, anatomical, morphological, and physiological responses to salinity stress in wheat and barley genotypes deferring in salinity tolerance. *Agronomy*, 10(1), 127.
42. Zhu, G.A., Y. Jiang, Q. Yang, J.F. Wang, J.I. Huang and H.S. Zhang. (2006). Isolation and characterization of a new Na^+/H^+ antiporter gene *OsNHAI* from rice. *Oryza sativa L. DNA Sequence*, 17, 24-30
43. Zhu, M., Shabala, S., Shabala, L., Fan, Y., & Zhou, M. X. (2016). Evaluating predictive values of various physiological indices for salinity stress tolerance in wheat. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 202(2), 115-124.