



Research Paper

Ionic and Transcriptomic Responses of Quinoa to Seawater Salinity Stress

Seyede Sanaz Ramezani¹, Hassan Soltanloo², Seyed Ebrahim Seifati³ and Sahar Sadat Hosseini⁴

1- Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran,

(Corresponding author: ramezani@saru.ac.ir)

2- Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

3- Assistant Professor, Department of Arid Land and Desert Management, School of Natural Resources and Desert Studies, Yazd University, Yazd, Iran

4- Ph. D., Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

Received: 29 October, 2023

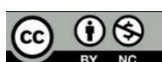
Accepted: 21 February, 2024

Extended Abstract

Background: Soil salinity is regarded as a primary cause of damage and decrease in agricultural yields globally. Halophyte plants can withstand elevated levels of salt, which typically result in the destruction of other crops. Quinoa (*Chenopodium quinoa*, Willd), belonging to Chenopodiaceae, is a very tolerant plant to unfavorable environmental conditions that exhibits great tolerance to biotic and abiotic stresses. Quinoa is an optional halophyte plant that can tolerate sea level salinity (40 dSm⁻¹) and has a favorable economic performance in most areas of Iran with little annual rainfall (the country's average rainfall is about 250 mm) and cannot be cultivated due to soil salinity and drought. To explore the mechanisms of resistance to salt stress in quinoa plants, the impact of salt treatments at two different levels (6.9 and 13.8 dSm⁻¹) and nine sampling intervals (ranging from zero to seven days) was studied in the Titicaca variety. This involved analyzing the ionic reactions and the expression of specific genes related to dealing with salt stress.

Methods: to study the ionic changes and reactions of some genes involved in salinity stress, the Titicaca genotype was planted under the effect of two salinity levels 6.9 dSm⁻¹ (1:1 seawater:double distilled water) and 13.8 dSm⁻¹ (sea water) along with a control in two replications with the factor of sampling time using factorial (time in nine levels and salinity in two levels) based on a completely randomized design. After applying salt treatments, leaf samples were collected at 6 hours and 1, 2, 3, 4, 5, 6, and 7 days after salt application. The accumulation of sodium and potassium ions along with the expression changes in four salinity-related genes, including Na⁺/H⁺ antiporter (*NHX*), Salt Overly Sensitive 1 (*SOS1*), Choline Mono Oxygenase (*CMO*), and Betaine aldehyde dehydrogenase (*BADH*), were evaluated in this research. The gene expression was assessed using the QRT-PCR technique with SyberGreen dye and the GAPDH reference gene.

Results: The accumulation of sodium and potassium ions in leaves was impacted by salinity, and there was a significant increase in both levels of salinity at the 1% probability level. An increase in sodium ions was associated with the increased accumulation of potassium ions, indicating that the plant attempted to counteract the negative effects of elevated sodium ions resulting from stress conditions. Additionally, by elevating the salinity level from 6.9 to 13.8 dSm⁻¹, the potassium ion to sodium ion ratio started to increase from the third day after stress. This could serve as a crucial physiological mechanism for enhancing the plant's salinity tolerance and promoting higher productivity in saline environments. With increasing the duration of stress and the salt concentration, the activation of all four genes associated with salinity was altered in response to the buildup and existence of ions within the cell. Based on the current research, the activation of the *NHX* gene in quinoa was observed from the initial day under both salinity stress levels. The activation of the *SOS1* gene was escalated as the stress persisted in the subsequent days. In this context, the expression pattern of *SOS1* demonstrated a rise at 6.9 dSm⁻¹ on the initial, subsequent, and third days. On the third day of stress, the activity of genes related to glycine betaine production rose at both stress levels. First, the *CMO* gene showed increased activity, followed by an increase in the activity of the *BADH* gene.



Conclusion: Based on the findings of this study, the quinoa crop, similar to other salt-tolerant plants, employs various strategies (such as ionic balance and alterations in gene expression) to endure saline conditions. The research findings indicate that there was a notable rise in the *NHX1* gene expression following the introduction of the sodium ion into the cytosol and receipt of the stress signal. Upon this heightened expression, the plant attempted to chelate sodium ions to mitigate the impact of stress in the vacuole. Additionally, it appears that the plant utilizes the *SOS1* gene to initiate an alternative pathway for achieving tolerance and cell stability. This involves releasing sodium ions to the root area, storing them in vacuoles, preventing their build-up in the cytoplasm, and regulating sodium transport over long distances between the roots and leaves. The process also involves the selected loading of sodium ions from the xylem vessels. On the third day, there was a rise in the expression of the *CMO* gene at the same time as the notable rise of sodium ions in the cytosol, indicating the plant's effort to achieve osmotic equilibrium in the cell by generating glycine-betaine osmolyte and activating the proline synthesis pathway. Alternatively, the plant seeks to preserve the ionic equilibrium by boosting potassium intake and enhancing the stability of the K^+/Na^+ ratio to mitigate the detrimental impact of stress. Because of inadequate research on this crucial plant, the results of this study can serve as an appropriate blueprint for future research.

Keywords: *BADH*, *CMO*, Gene expression, *NHX*, Sodium ion accumulation, *SOS1*

How to Cite This Article: Ramezanpour, A., Soltanloo, H., Seifati, E., & Hosseini, S. (2024). Ionic and Transcriptomic Responses of Quinoa to Seawater Salinity Stress. *J Crop Breed*, 16(3), 37-51. DOI: 10.61186/jcb.16.3.37



مقاله پژوهشی

پاسخ‌های یونی و ترنسکریپتومی کینوا به تنش شوری آب دریا

سیده ساناز رمضانپور^۱، حسن سلطانلو^۲، سیدابراهیم سیفتی^۳ و سحر سادات حسینی^۴

۱- دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران، (نویسنده مسوول: ramezanpours@gau.ac.ir)

۲- دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۳- استادیار، گروه مدیریت مناطق خشک و بیابانی، دانشکده منابع طبیعی و کوبرشناسی، دانشگاه یزد، یزد، ایران

۴- دانش‌آموخته دکتری، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۲۰

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۸/۷

صفحه: ۳۷ تا ۵۱

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: شوری خاک یکی از عوامل اصلی خسارت و کاهش عملکرد محصولات کشاورزی در دنیا به‌شمار می‌رود. گیاهان هالوفیت قادر به تحمل سطوح بالایی از شوری هستند که این سطوح در حالت معمول باعث از بین رفتن محصولات زراعی دیگر می‌شود. کینوا (*Chenopodium quinoa*, Willd) از خانواده Chenopodiaceae گیاهی بسیار متحمل به شرایط نامطلوب محیطی است که در برابر تنش‌های زنده و غیرزنده تحمل بالایی را از خود نشان می‌دهد. کینوا یک گیاه شورزیست اختیاری است که قادر است شوری سطح دریا (40 dSm^{-1}) را تحمل کند و در بیشتر مناطق ایران که بارندگی سالیانه اندکی دارند (میانگین بارندگی کشور حدود ۲۵۰ میلی‌متر است) و به دلیل شوری و خشکی خاک غیرقابل کشت هستند، عملکرد اقتصادی مطلوبی را داشته باشد. در همین راستا و به منظور بررسی سازوکارهای تحمل به تنش شوری در گیاه کینوا اثرات تیمارهای شوری در دو سطح شوری ($6/9 \text{ dSm}^{-1}$ و $13/8 \text{ dSm}^{-1}$) و ۹ زمان نمونه‌برداری (از صفر تا هفت روز) در وارینه تیتیکاکا با بررسی پاسخ‌های یونی و بیان برخی ژن‌های درگیر در مقابله با تنش شوری مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: به جهت بررسی تغییرات یونی و واکنش برخی ژن‌های مهم دخیل در تنش شوری، ژنوتیپ تیتیکاکا (Titicaca) تحت تاثیر دو سطح شوری $6/9 \text{ dSm}^{-1}$ (مخلوط ۱:۱ آب دریا و آب مقطر) و $13/8 \text{ dSm}^{-1}$ (آب دریا) در دو تکرار با در نظر گرفتن عامل زمان نمونه‌برداری، با استفاده از آزمایش فاکتوریل (فاکتور زمان در ۹ سطح و فاکتور شوری در ۲ سطح) در قالب طرح کاملاً تصادفی کشت شد. نمونه‌های برگ‌ی در بازه‌های زمانی شش ساعت و نیز یک، دو، سه، چهار، پنج، شش و هفت روز پس از اعمال تنش، تهیه شدند. در این پژوهش میزان تجمع یون‌های سدیم و پتاسیم و تغییرات بیان چهار ژن مرتبط با شوری شامل آنتی پورتر غشای واکوئلی (NHX)، آنتی پورتر Na^+/H^+ واقع در غشای پلاسمایی (SOS1)، کولین مونواکسیژناز (CMO) و بتائین‌ال‌دئیدهدیروژناز (BADH) مورد بررسی قرار گرفت. به منظور بررسی بیان ژن از روش qRT-PCR با استفاده از ماده سایبرگرین و ژن خانه‌دار GAPDH استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد تجمع میزان یون‌های سدیم و پتاسیم در برگ تحت تاثیر شوری قرار گرفت و در سطح احتمال یک درصد، در هر دو سطح شوری روند صعودی و معنی‌داری داشتند، به طوری که با افزایش میزان یون سدیم، میزان تجمع یون پتاسیم نیز افزایش داشته و این بدان معنی است که گیاه سعی در خنثی‌سازی اثرات نامطلوب افزایش یون سدیم ناشی از شرایط تنش داشته است. همچنین با افزایش میزان غلظت شوری از سطح $6/9 \text{ dSm}^{-1}$ به $13/8 \text{ dSm}^{-1}$ ، از روز سوم اعمال تنش، نسبت یون‌های پتاسیم به سدیم افزایش یافته که می‌تواند یک سازوکار فیزیولوژیکی بسیار مهم در جهت افزایش میزان تحمل به شوری این گیاه و تلاش برای تولید و عملکرد بیشتر تحت شرایط شور باشد. با افزایش روزهای تنش و نیز سطح شوری اعمال شده، بیان هر چهار ژن مرتبط به شوری متناسب با تجمع و حضور یون‌ها در سلول تغییر یافت. بر اساس مطالعه حاضر ژن NHX در کینوا در هر دو سطح تنش $6/9 \text{ dSm}^{-1}$ و $13/8 \text{ dSm}^{-1}$ شوری در روز اول شروع به بیان نموده و با ادامه روند تنش در روزهای بعدی، بیان ژن SOS1 نیز افزایش یافت. در همین راستا ژن SOS1 افزایش بیان را در سطح $6/9 \text{ dSm}^{-1}$ در روزهای اول، دوم و سوم نشان داد. با افزایش روزهای تنش بیان ژن‌های درگیر در ساخت گلاسیسین بتائین در روز سوم در هر دو سطح تنش، بیان ژن CMO و سپس بیان ژن BADH افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج این تحقیق گیاه کینوا نیز همچون سایر هالوفیت‌ها از سازوکارهای متعددی از جمله تنظیم یونی و تغییر در الگوی بیان ژن‌ها جهت تحمل تنش شوری استفاده می‌نماید. بررسی‌های این مطالعه نشان می‌دهد بعد از ورود یون سدیم به درون سیتوسول و دریافت سیگنال تنش، بیان ژن NHX1 به‌طور چشم‌گیری افزایش معنی‌داری یافت و گیاه با این افزایش بیان این ژن، سعی نموده تا با کده‌بندی یون سدیم در واکوئل از اثرات ناشی از تنش بکاهد. همچنین به نظر می‌رسد با فعال شدن SOS1، گیاه مسیر دومی را نیز جهت برقراری تحمل و هموستازی سلولی از طریق خروج یون سدیم به منطقه ریشه، ذخیره یون سدیم در واکوئل و جلوگیری از تجمع آن در سیتوپلاسم و کنترل انتقال یون سدیم در مسیرهای طولانی بین ریشه و برگ‌ها و بارگیری آن از آوند چوبی را انتخاب نموده است. در روز سوم و هم‌زمان با افزایش معنی‌دار یون سدیم درون سیتوسول، میزان بیان ژن CMO نیز افزایش پیدا کرده که نشان می‌دهد گیاه سعی کرده با تولید اسمولیت‌های گلاسیسین بتائین و همچنین فعال نمودن مسیر پرولین تعادل اسمزی در سلول را حفظ کند. از سوی دیگر گیاه با افزایش جذب یون پتاسیم و ثبات نسبت K^+/Na^+ سعی در حفظ تعادل یونی نموده تا بتواند اثرات مخرب ناشی از تنش را کاهش دهد. با توجه به وجود تحقیقات محدود در زمینه این گیاه مهم، یافته‌های این تحقیق می‌تواند به‌عنوان راه‌گشای مناسبی برای تحقیقات بعدی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، تجمع یون سدیم، BADH، CMO، NHX، SOS1

Moog et al., 2022). کینوا با نام علمی *Chenopodium**quinoa*, Willd. متعلق به خانواده Chenopodiaceae.

گیاهی بسیار متحمل به شرایط نامطلوب محیطی است که در برابر تنش‌های زنده و غیرزنده تحمل بالایی را از خود نشان می‌دهد (Jacobsen, 2003). بسیاری از هالوفیت‌ها مانند کینوا توسط لایه‌ای از سلول‌های کیسه اپیدرمی (Epidermal bladder cells) پوشیده شده‌اند که تصور می‌شود به‌عنوان مخزن‌های نمکی باعث تحمل شوری در گیاه می‌شوند (Moog et al., 2022). این گیاه به شرایط بیابانی و گرم و

مقدمه

شوری خاک که ۲۵ تا ۳۰ درصد از کل زمین‌های کشت آبی را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Zaman, Shahid, & Heng, 2018)، به‌ویژه در کشورهای خشک و نیمه‌خشک که برای کشاورزی به آبیاری وابسته هستند، باعث تلفات عمده محصولات کشاورزی می‌شود (Liu, Pan, Allakhverdiev, Yu, & Shabala, 2020). هالوفیت‌ها سطوح بالایی از شوری را تحمل می‌کنند که این سطوح در حالت معمول باعث از بین رفتن محصولات زراعی می‌شود (Mishra & Tanna, 2017;)

کاربردی و پیچیده ژن *CqNHX1* در هموستازی یونی، جهت کنترل تنش شوری مورد بررسی قرار گرفته است. طبق نتایج مطالعات مختلف، هنگامی که گیاهان در ۳۰۰ میلی‌مولار NaCl رشد کردند، نه تنها کاهشی در رشد مشاهده نشد، بلکه افزایش بیان ژن *CqNHX1* در ساقه‌ها و ریشه‌ها مشاهده شد (Ruiz-Carrasco *et al.*, 2011; Ruiz *et al.*, 2016;) (Ruiz *et al.*, 2017).

هنگامی که آب محدود است، ریشه‌های کینوا تا عمق بیشتر رشد می‌کنند، گیاه به سرعت روزه‌های خود را می‌بندد و مواد پالایش کننده ROS، آنتی‌اکسیدان‌ها (مانند اورنیتین و رافینوز) و محافظت کننده‌های اسمزی (مانند قندهای محلول و پرولین) تولید می‌کند (Hinojosa *et al.*, 2018). تجزیه و تحلیل بیان ژن نشان داد که سیگنال دهی ABA، پروتئین‌های شوک حرارتی (HSPs) و بیوسنتز فلاونوئیدها در پاسخ به خشکی و شوری در کینوا نقش دارند (Hinojosa *et al.*, 2017; Hosseini *et al.*, 2018). زمانی که کینوا تحت تنش شوری است، K^+ را حفظ کرده و Na^+ را از طریق سازوکارهای مختلف، از جمله کده‌بندی Na^+ و واکوئل‌های برگ از طریق آنتی‌پورتر *NHX1* (Ruiz *et al.*, 2016) حذف Na^+ در ریشه‌ها از طریق مسیر *SOS1*، دفع می‌کند (Maughan *et al.*, 2009). مشابه تنش خشکی، تنش شوری در کینوا منجر به بسته شدن روزه، کاهش کارایی فتوسنتزی و تجمع ROS می‌شود (Adolf *et al.*, 2013) که می‌تواند از طریق افزایش تراکم منافذ و تنظیم افزایش فعالیت پاک‌کننده‌های ROS مانند سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، پراکسیداز (POD)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و کاتالاز (CAT) تعدیل شود (Han *et al.*, 2023). علاوه بر این، تجزیه و تحلیل بیان ژن‌ها نشان داده است که سیگنال دهی ABA و متابولیسم بتائین نقش مهمی در پاسخ به تنش نمک در کینوا دارد (Ruiz *et al.*, 2017).

مسیر *SOS* تنها توسط تنش شوری فعال می‌شود. در حالی که در تنش خشکی و سرما سایر مسیرها فعال می‌شوند (Xiong *et al.*, 2002). موگان و همکاران (Maughan *et al.*, 2009) همسانه‌سازی و شناسایی دو مکان ژنی *SOS1* همولوگ (*cqSOS1A* و *cqSOS1B*) شامل تمام طول توالی cDNA، توالی‌یابی ژنومیک، سطوح بیان نسبی، آنالیز FISH (Fluorescent *In Situ* Hybridization) و آنالیز فیلوژنی ژن‌های *SOS1* را بر روی ۱۳ گیاه کینوا مورد مطالعه قراردادند. این مطالعه اولین توصیف مولکولی ژن‌های دخیل در تحمل به تنش شوری در یک گونه شورپسند خانواده تاج‌خروس و نیز اولین بررسی مقایسه‌ای توالی رمزدار و غیررمزدار DNA دو ژنوم همولوگ کینوا بود. روئیز-کاراسکو و همکاران (Ruiz-Carrasco *et al.*, 2011)، به منظور مطالعه سازوکار تحمل به شوری، چهار ژنوتیپ کینوا که از مناطق مرکزی و جنوبی ساحلی انتخاب شده بودند را براساس میزان رشد و پاسخ فیزیولوژیکی و مولکولی به NaCl در مرحله گیاهچه‌ای مورد بررسی قراردادند. بذرها روی پتری‌های حاوی ۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌مول نمک NaCl کشت شدند. تنها در یکی از ژنوتیپ‌ها (BO78) به طور معنی‌دار کاهش جوانه‌زنی مشاهده شد. طول

اقلیم خشک سازگار بوده و در مناطقی با رطوبت ۴۰ تا ۸۸ درصد می‌تواند رشد کند و دمای ۴- تا ۳۸ درجه سانتی‌گراد را تحمل می‌کند. این گیاه که اولین بار توسط Willdenow در سال ۱۷۷۸ معرفی و تاکنون مطالعات گسترده‌ای بر روی اکثر جنبه‌های آن صورت گرفته است (Quinoa & Caribbean, 2011)، کارایی بالایی در استفاده از آب دارد، به تنش خشکی متحمل است و عملکرد قابل‌قبولی در مناطقی با بارندگی ۱۰۰ تا ۲۰۰ میلی‌متر تولید می‌کند. کینوا یک گیاه شورزیست اختیاری است که قادر است شوری سطح دریا (40 dSm^{-1}) را تحمل کند (Jacobsen, 2003). همچنین این گیاه می‌تواند شوری (Hariadi, Marandon, Tian, Jacobsen, & Shabala, 2011; Jacobsen, 2003; Rosa, Hilal, Gonzalez, Prado, & biochemistry, 2009; Sven-Erik Jacobsen, Liu, & Jensen, 2009)، یخبندان و تگرگ (Jacobsen *et al.*, 2007;)، را تحمل نماید و در بیشتر مناطق ایران که بارندگی سالیانه اندکی دارند (میانگین بارندگی کشور حدود ۲۵۰ میلی‌متر است) و به دلیل شوری و خشکی خاک غیرقابل کشت هستند، عملکرد اقتصادی مطلوبی را داشته باشد. در گیاهان یک مکانیزم عمده در نقل و انتقال Na^+ سیتوزولی و کاهش اثرات سمی آن وجود دارد که باعث جایگذاری مقادیر اضافی یون‌های سدیم در واکوئل‌ها یا بافت‌هایی با حساسیت کمتر می‌شود که این کار توسط آنتی‌پورتر غشای واکوئل (NHX) صورت می‌گیرد. ژن *NHX* یک ژن بسیار مهم در تنش شوری محسوب می‌شود که در واقع مخفف Na^+/H^+ antiporter می‌باشد. حذف Na^+ از سیتوپلاسم عمدتاً توسط دو ژن رمزگذاری می‌شود. یکی از ژن‌ها *Salt Overly Sensitive 1 (SOS1)* است که یک آنتی‌پورتر Na^+/H^+ واقع در غشای پلاسمایی سلول‌های ریشه اپیدرم را رمزگذاری می‌کند و Na^+ را از سلول خارج می‌کند. ژن دیگر *NHX1* است که Na^+ را در داخل واکوئل جدا می‌کند (Hinojosa *et al.*, 2018). در گیاهان، یون پتاسیم (K^+) درون سلولی و تعادل هموستازی یون سدیم (Na^+) برای فعالیت بسیاری از آنزیم‌های سیتوزولی، حفظ پتانسیل غشا و تورم سلول‌های گیاهی مهم و حیاتی است. تحت شرایط غلظت بالای نمک بیرونی، نگر داشتن تعادل و هموستازی یون پتاسیم (K^+) و یون سدیم (Na^+) به جهت تقلیل اثرات مضر تنش شوری، بسیار مهم خواهد بود (Zhu, 2003). تحمل به شوری می‌تواند توسط سه مکانیسم مهم شامل دفع Na^+ از ساقه، تحمل Na^+ در بافت و تعدیل اسمزی که هموستازی یون سدیم (Na^+) را تحت تأثیر قرار می‌دهند، ایجاد شود (Apse & Blumwald, 2007; Munns & Tester, 2008; Tuteja, 2007). ژن‌های مؤثر مربوط به نقل و انتقال Na^+ در چندین گونه مطالعه شده‌اند و نقش آن‌ها در تحمل شوری به وسیله بیش بیان ژن یا همولوگ آن از سایر گونه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفته است (Berthomieu *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2003). *NHX* یک ژن رمزکننده آنتی‌پورتر Na^+/H^+ غشای تونوپلاستی است که بیان بالایی آن به عنوان مرحله آغازین کده‌بندی یون‌های سدیم و پتاسیم در واکوئل در نظر گرفته می‌شود (Leidi *et al.*, 2010). نقش

BADH نسبت به تنش شوری پاسخ داده و نقش مهمی در تحمل تنش شوری نهال‌های کینوا، به‌ویژه در غلظت‌های بالای NaCl، ایفا می‌کند، زیرا قبل از ۲۴ ساعت تحت تیمار شوری ۱۰۰ میلی‌مولاری، افزایش بیان نشان داد (Jiang *et al.*, 2022).

هدف از پژوهش حاضر بررسی اثرات تیمارهای شوری در دو سطح شوری ($6/9 \text{ dSm}^{-1}$ و $13/8 \text{ dSm}^{-1}$) و ۹ زمان نمونه‌برداری (از صفر تا هفت روز) بر کینوا واریته تیتیکاکا با بررسی ژن‌های درگیر در مقابله با تنش بود. این مطالعه بینش‌های ارزشمندی را در مورد سازوکارهای مولکولی نهفته در تحمل شوری کینوا ارائه می‌دهد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در ایستگاه تحقیقات کشاورزی عراقی محله مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان و دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. برای این منظور، ژنوتیپ تیتیکاکا (Titicaca) که رقم زودرس و بسیار متحمل به شرایط نامطلوب محیطی از جمله شوری، خشکی و سرما می‌باشد (Pulvento *et al.*, 2012; Riccardi *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2014) تحت تأثیر دو سطح شوری ($6/9 \text{ dSm}^{-1}$ (مخلوط ۱:۱ آب مقطر و آب دریا) و $13/8 \text{ dSm}^{-1}$ (آب دریا) در دو تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی کشت شد. لازم به ذکر است انتخاب این رقم بر اساس مطالعه انجام شده توسط سیفتی و همکاران (Seifati *et al.*, 2015) انجام شد. خاک هر گلدان با توجه به مطالعات انجام شده، به‌صورت لومی و مخلوط شن و هوموس (نسبت ۲:۱) انتخاب شد. بذور رقم موردنظر در گلدان‌هایی با قطر ۲۶ سانتی‌متر کشت و آبیاری با آب معمولی تا انتهای فاز رویشی انجام شد. با شروع فاز زایشی و اعمال تیمارهای شوری، در بازه‌های زمانی صفر و شش ساعت و نیز یک، دو، سه، چهار، پنج، شش و هفت روز پس از اعمال تیمار شوری، نمونه برگ‌ها تهیه و پس از انجماد سریع در ازلت مایع، به یخچال -80°C درجه‌سانتی‌گراد منتقل شد.

برای اندازه‌گیری یون Na^{+} و K^{+} از ماده خشک برگ گیاه استفاده شد. در زمان برداشت، نمونه‌ها با آب سرد و با آب مقطر دیونیزه شسته تا عناصر موجود در دیواره سلولی خارج گردد. برگ‌ها در دمای 70°C درجه‌سانتی‌گراد و به‌مدت ۴۸ ساعت در آون قرار گرفته تا کاملاً خشک شود و به‌خوبی آسیاب شود. یک تا دو گرم از ماده خشک در پنج میلی‌لیتر اسید نیتریک $0/2$ نرمال در دمای 100°C درجه‌سانتی‌گراد بر روی هیتر برقی به‌مدت یک ساعت مخلوط شد، محلول استخراج شده از کاغذ صافی عبور داده شد، سپس محلول با آب مقطر رقیق گردید. در این مرحله یون‌های سدیم و پتاسیم به‌وسیله دستگاه فلیم‌فتومتر (Flame Photometer) اندازه‌گیری شد (Ashraf *et al.*, 2001).

به‌منظور استخراج RNA از بافر p-BIOZOL شرکت Bioflux (توکيو، ژاپن) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. جهت تعیین کمیت RNA استخراج شده از دستگاه Nanophotometer مدل p300 محصول شرکت IPMLLEN و تأیید کیفیت RNAهای استخراج شده، از الکتروفورز افقی

ساقه در سه ژنوتیپ از چهار ژنوتیپ در پتری‌های حاوی 150 میلی‌مول نمک، کاهش معنی‌دار نشان داد. طول ریشه در تیمار 150 میلی‌مول نمک در هر چهار ژنوتیپ شدیداً متأثر از تنش شوری بود، اما در ژنوتیپ BO78 حتی تا 300 میلی‌مول هم تحمل دیده شد؛ بنابراین مشاهده شد که ریشه و ساقه در تنش شوری تحت تأثیر قرار گرفته و کاهش خواهند داشت، اما کمترین میزان کاهش و یا تغییر مربوط به زیست توده بود. تجزیه qRT-PCR دو ژن انتقال‌دهنده سدیم (*CqSOS1*) و (*CqNHX*) نشان داد که بیان آن‌ها القا متفاوتی در ساقه و ریشه دارد.

از جمله ترکیبات آلی که در گیاه برای مقابله با تنش افزایش می‌یابد، گلیسین‌بتائین می‌باشد (Ruiz *et al.*, 2017). تنش‌های محیطی شامل کمبود آب، شوری و دمای پایین باعث تجمع گلیسین‌بتائین در برخی گیاهان می‌شود. آنزیم کولین‌مونواکسیژناز (Choline Mono Oxygenase) یکی از اجزای کلیدی در مسیر بیوشیمیایی سنتز گلیسین‌بتائین است، که نقش مهمی را در سازگاری گیاهان به تنش‌های غیرزیستی ایفا می‌کند (Zangishei & Salari, 2016). محققین در مطالعه‌ای بر روی جداسازی و شناسایی پروموتورهای ژن CMO در هالوفیت *Suaeda liaotungensis* K. بیان نمودند که پروموتور ژن *SICMO* حاوی عناصر پایه‌ای جعبه TATA، جعبه CAAT و عناصر ناشی از تنش مثل عنصر پاسخ‌دهنده به نمک (GAAAAA)، عناصر حساس به سرما (CANNTG)، عناصر پاسخنکو به آبسزیک اسید (NAACAA) و عنصر مربوط به تنش کم آبی (CGGTTG) می‌باشد (Li *et al.*, 2004).

در گیاهان عالی، پستانداران و باکتری‌ها ژنی به‌نام بتائین‌لدئید دهیدروژناز (*BADH*) وجود دارد. این ژن، آنزیمی را رمز می‌کند که قادر است بتائین‌لدئید سمی را به ماده غیرسمی گلیسین‌بتائین تبدیل نماید (Sakamoto & Murata, 2000). حضور گلیسین‌بتائین در سلول باعث محافظت اسمزی گیاه در برابر نمک و یا تنش محیطی می‌گردد. در گیاهان و باکتری‌ها گلیسین‌بتائین ضمن بالابردن قدرت اسمزی سلول، مانع عملکرد آن نمی‌شود. اگر در کشت سلولی برای انتخاب سلول‌های نوترکیب از بتائین‌لدئید استفاده گردد با استفاده از ژن *BADH* ترانسفورم شده می‌توان عمل غربال‌گری را انجام داد. بتائین‌لدئید دهیدروژناز (*BADH*) قادر به زدودن بتائین‌لدئید در سلول گیاهی بوده و سلول‌های گیاهی ترانسفورم شده در محیط کشت حاوی بتائین‌لدئید رشد کرده و با این تکنیک سلول‌های ترانسفورم شده را می‌توان انتخاب نمود (Sakamoto & Murata, 2000). در واقع *BADH* آخرین مرحله در سنتز گلیسین‌بتائین بوده و مشخص گردیده که در طی تنش شوری، ساخت mRNA و آنزیم *BADH* افزایش می‌یابد. براساس مطالعاتی که انجام شده است، احتمال آن می‌رود که در گیاه کینوا ژن‌های بسیار فعال *BADH* وجود داشته باشند (Morales *et al.*, 2011) که آنزیم‌های لازم برای تبدیل بتائین‌لدئید به گلیسین‌بتائین را رمز می‌کنند (Dini *et al.*, 2006). در آزمایشی مشخص شد که سطوح

۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. جهت به‌دست آوردن دمای بهینه آغازگرها برای واکنش qRT-PCR و بررسی cDNA، از دستگاه ترموسایکلر مدل Bio-Rad و واکنش PCR استاندارد استفاده شد.

در این تحقیق از توالی آغازگرهای اختصاصی دو ژن اصلی دخیل در مسیر سنتز گلايسين بتائين (کولین مونوکسیژناز و بتائین‌آلدئیددهیدروژناز)، ژن فوق حساس شوری (*SOS1*)، ژن آنتی‌پورتر غشای واکنشی (*NHX*) و آغازگر ژن خانه‌دار (*GAPDH*) استفاده شد. مشخصات آغازگرها در جدول ۱ آورده شده است. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز کمی با استفاده از تکنولوژی رنگ Sybr Green I و کیت سایبرپوپارس (دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران) در دستگاه iQ5 (شرکت بیورد، آمریکا) انجام شد. شرایط بهینه برای اجرای واکنش Real-Time PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر محلول سایبر بیوپارس (۲x)، ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای پیشرو و پسرو با غلظت ۱۰ میکرومولار، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase با غلظت ۵ واحد در میکرولیتر، ۳ میکرولیتر cDNA و آب دیونیزه دوبار تقطیر تا حجم ۲۰ میکرولیتر بود. واکنش‌ها برای هر نمونه در سه تکرار تکنیکی انجام شد. جهت انجام Real-Time PCR از دمای اتصال بهینه هر آغازگر استفاده شد. در پایان واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز نیز منحنی ذوب به‌منظور بررسی تکثیر اختصاصی آغازگرها رسم گردید. مقایسه سطوح بیان ژن‌های مورد بررسی به‌صورت جداگانه در دو سطح شوری $6/9 \text{ dSm}^{-1}$ و $13/8 \text{ dSm}^{-1}$ انجام شد.

ژل آگارز یک درصد استفاده شد. رنگ‌آمیزی ژل با استفاده از ماده سایبرگلد انجام شد و پس از رنگ‌آمیزی، با استفاده از دستگاه عکس‌برداری ژل، باندهای موردنظر بررسی شدند. برای حذف DNA از نمونه‌های RNA از دستورالعمل شرکت فرمنتاز و آنزیم *DNase I* استفاده شد. با استفاده از داده‌های دستگاه نانوفتومتر مقدار RNA موردنیاز محاسبه شد. سپس یک واحد آنزیم *DNase I*، یک میکرولیتر بافر $10 \times \text{DNase I}$ و ۱۰ واحد آنزیم (*Ribolock*) *RNase inhibitor* اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در دستگاه آنکوباتور قرار گرفت. در مرحله بعدی یک میکرولیتر EDTA (۲۵ میلی‌مولار) به محلول واکنش اضافه و ۱۰ ثانیه با دور بالا سانتریفیوژ شد، سپس تیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه هیت بلاک با دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پنج میکرولیتر از RNA تیمار شده با آنزیم *DNase I* به تیوب جدید منتقل شده و به آن یک میکرولیتر آغازگر الگو دی‌تی به غلظت یک میکرومولار و پنج میکرولیتر آب مقطر اتوکلاو شده اضافه شد. تیوب‌ها به مدت پنج دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. چهار میکرولیتر بافر $M\text{-MuIV-RT } \times 5$ ، دو میکرولیتر dNTP با غلظت ۱۰ میکرومولار، ۲۰ واحد آنزیم (*Ribolock RNase Inhibitor*) و ۱/۵ میکرولیتر آب استریل به هر تیوب اضافه شد و تیوب‌ها به مدت پنج دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس ۲۰۰ واحد آنزیم رونوشت بردار معکوس به تیوب اضافه شده و تیوب‌ها در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت در آنکوباتور قرار داده شدند. سپس تیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. نمونه‌ها تا زمان استفاده در فریزر منفی

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی

Table 1. characterization of primers used in Quantitative real-time PCR experiment

شماره دسترسی Accession	نام ژن Gene name	نام آغازگر Primer name	توالی آغازگر Primer sequence	دمای اتصال Annealing temperature	طول محصول (جفت باز) Product size (bp)
XM_021889592.1	<i>GAPDH</i>	Forward	3'-GGTACAGTCATTCAGACACCATCA-5'	62.40	168
		Reverse	3'-AACAAAGGGAGCCAAGCAGTT-5'	62.37	
AY371319.1	<i>NHX1</i>	Forward	3'-GCACCTTCTGTTGCTGTGAGTTCCA-5'	66.03	215
		Reverse	3'-TGTGCCCTGACCTCGTAAACTGAT-5'	66.16	
EU024570.1	<i>SOS1</i>	Forward	3'-GTGGCTAGTGGGTCTCAAC-5'	59.58	238
		Reverse	3'-GACGGGAGGAGAATTAACA-5'	58.98	
E39979.1	<i>CMO</i>	Forward	3'-ACATCGAGAAGGGCATAGCA-5'	60.77	94
		Reverse	3'-ATACGCAGGTGTCTCCAACC-5'	60.00	
KP774603.1	<i>BADH</i>	Forward	3'-TGCCCAGCTAGTTAAGCCTGT-5'	61.29	244
		Reverse	3'-GGCATCCTCTCAAATGG-5'	60.41	

متقابل در مورد میزان تجمع سدیم و پتاسیم در برگ در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد. بیشترین میزان تجمع یون سدیم و پتاسیم مربوط به روز پنجم در سطح شوری $13/8 \text{ dSm}^{-1}$ (به ترتیب ۶۹/۴ و ۵۶/۸ میلی‌گرم بر گرم) بود که البته این افزایش در سطح $13/8 \text{ dSm}^{-1}$ نسبت به سطح $6/9 \text{ dSm}^{-1}$ شوری آب دریا افزایش معنی‌داری نشان داد. همچنین کمترین مقدار تجمع سدیم و پتاسیم در هر دو سطح تنش شوری تا یک روز پس از شروع تنش بود که با شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت. به‌طور کلی بررسی‌ها در این پژوهش روند کلی افزایشی برای یون سدیم را نشان می‌دهند که با مطالعات (Archangi et al., 2012) نیز مطابقت دارد.

نتایج و بحث

نقش یون‌های سدیم و پتاسیم در تحمل به تنش شوری
مکانیزم‌های بیولوژیکی و مولکولی در گیاهان متحمل به شوری به‌خوبی شناخته نشده‌اند، اما مشخص شده است که تحمل به شوری تا حد زیادی مربوط به تجمع سدیم در بافت گیاه و افزایش توانایی در جذب انتخابی پتاسیم از محیطی که دارای مقادیر زیاد سدیم است، می‌باشد (Bybordi & Tabatabaei, 2009). براساس نتایج حاصل از این پژوهش، تجمع میزان سدیم و پتاسیم در برگ تحت تاثیر شوری قرار گرفت و در سطح احتمال یک درصد، در هر دو سطح شوری روند صعودی و معنی‌داری داشتند. طبق نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲) و بررسی شکل‌های ۱ و ۲ تمامی اثرات ساده و

جدول ۲- تجزیه واریانس میزان یون های سدیم و پتاسیم در دو سطح شوری در زمان های مختلف در گیاه کینوا
 Table 2. Analysis of variance of sodium and potassium ion content under two salt stress level in different time in Quinoa

میانگین مربعات Mean square		درجه آزادی df	منبع تغییرات Source of variation
پتاسیم (K ⁺) Potassium	سدیم (Na ⁺) Sodium		
822.34**	1318.82**	8	زمان Time
233047**	2254.82**	1	تنش Stress
184.81**	100.52**	8	زمان*تنش Time*Stress
14.09	13.81	18	خطای آزمایشی Experimental error
304.04	395.95	35	کل Total
14.23	9.99		ضریب تغییرات (C.V%) Coefficient of Variation

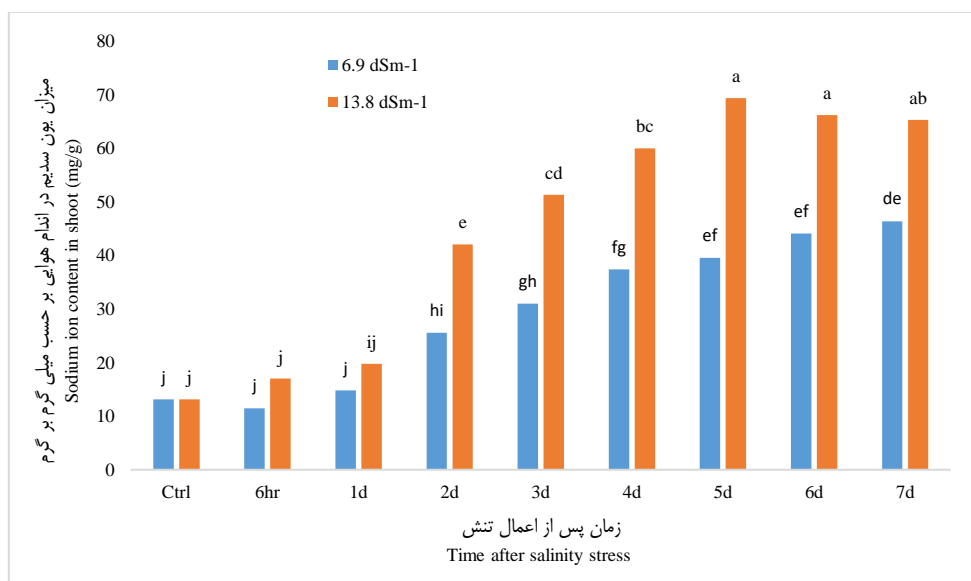
** Significant in 1 percent p value

** معنی داری در سطح احتمال ۱ درصد

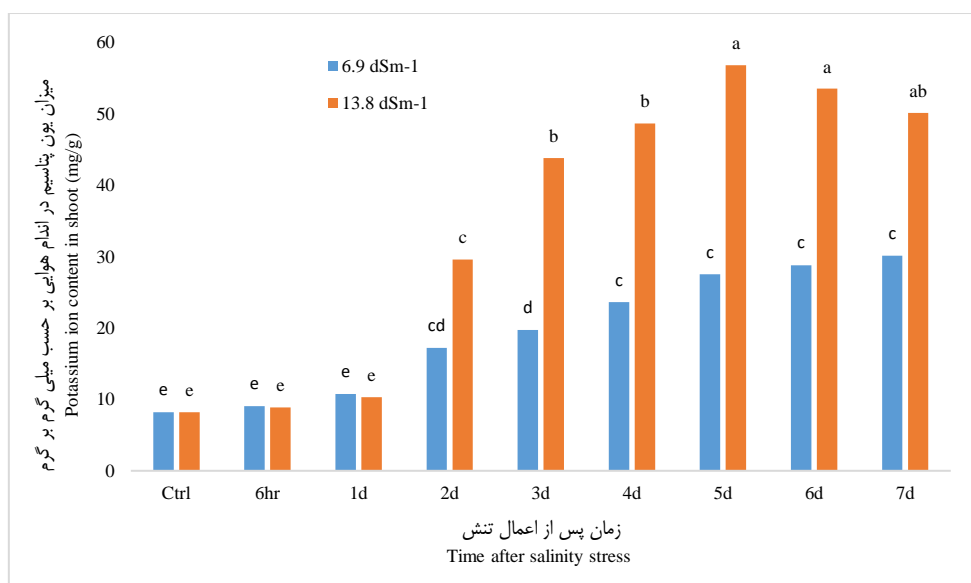
در این گیاه، کوچک بودن نسبت سدیم به پتاسیم (Na^+/K^+) با تحمل به شوری ارتباط داشته و کاهش عملکرد تحت شرایط شوری با افزایش این نسبت اتفاق خواهد افتاد، به طوری که نسبت یون های پتاسیم به سدیم (K^+/Na^+) در اندام هوایی و ریشه ژنوتیپ های یولاف متحمل به شوری، بیشتر از ژنوتیپ های حساس است. همچنین راوری و همکاران (Ravari *et al.*, 2016) نه رقم گندم که از نسبت K^+/Na^+ بالایی تحت شرایط شور برخوردار بودند را به عنوان متحمل ترین ارقام نسبت به تنش شوری انتخاب نمودند. تنظیم سازوکار سدیم و پتاسیم در گیاه ذرت نیز از طریق حفظ تعادل بین سلولی منجر به کاهش اثرات ناشی از تنش شوری شده است (Shakib Aylar *et al.*, 2021). پوستینی و سیوسمه مرده (Poustini & Siosemardeh, 2004) نیز در مطالعات خود به این نکته اشاره و تأکید کردند که میزان پتاسیم و نسبت پتاسیم به سدیم در گیاهان تحت شرایط شوری، می تواند به عنوان شاخص تحمل به شوری گیاه مدنظر قرار گیرد. در غلظت های بالای نمک، گیاهان با استفاده از ورود و خروج یون ها، میزان غلظت سدیم درون سیتوپلاسم را کاهش داده و با ثابت نگه داشتن غلظت پتاسیم، نسبت غلظت پتاسیم به سدیم را بالا نگه می دارند. این سازوکار به حدی در مقابله با اثرات سوء تنش شوری مؤثر است که نسبت غلظت پتاسیم به سدیم معیار تبعیض در گیاهان به عنوان یکی از خصوصیات مهم جهت تفکیک گونه های متحمل از حساس شده است (El - Hendawy *et al.*, 2009). از آنجایی که نسبت پتاسیم به سدیم از توارث پذیری عمومی بالایی برخوردار است، می توان از این صفت در برنامه های اصلاحی و گزینشی استفاده کرد (Khorshid *et al.*, 2021).

در این بین اما نقش مثبت یون پتاسیم در تحمل به شوری در گیاه کینوا و کاهش اثرات منفی تجمع یون سدیم را نیز نباید نادیده گرفت. مطالعه هم زمان شکل های ۱ و ۲ نشان می دهد در هر تیمار زمانی صرف نظر از سطح متفاوت شوری، با افزایش میزان سدیم، میزان تجمع یون پتاسیم نیز افزایش داشته و به نحوی گیاه سعی در خنثی سازی اثرات نامطلوب افزایش سدیم ناشی از شرایط تنش داشته است. در این راستا، اشرف و مک نیلی (Ashraf & McNeilly, 2004) در مطالعات خود، نقش مثبت یون پتاسیم در تحمل به تنش شوری، کاهش اثرات مضر افزایش سدیم و حفظ کارایی گیاهان مورد مطالعه را گزارش نمودند. به هر روی، مشاهده ای که می تواند به نوع خود در گیاه کینوا جالب و قابل بررسی باشد این است که با افزایش میزان غلظت شوری از سطح $6/9 \text{ dSm}^{-1}$ به $13/8 \text{ dSm}^{-1}$ ، از روز سوم اعمال تنش نسبت پتاسیم به سدیم افزایش یافته و این می تواند یک سازوکار فیزیولوژیکی بسیار مهم در جهت افزایش میزان تحمل به شوری این گیاه و تلاش برای تولید و عملکرد بیشتر تحت شرایط شور باشد (شکل ۳). همچنین با مشاهده روند نمودار K^+/Na^+ (شکل ۳) مشاهده می شود که این نسبت در روزهای ابتدایی و نیز در سطوح پایین تنش نسبت عکس با روزهای انتهایی اعمال تنش شوری و سطوح بالاتر تنش شوری آب دریا دارد. به طوری که هرچه روزهای اعمال تنش بیشتر شده و نمودار به سمت غلظت $13/8 \text{ dSm}^{-1}$ رفته است، تعادل یونی بیشتری در گیاه برقرار شده به نحوی که در روزهای انتهایی تنش $13/8 \text{ dSm}^{-1}$ هموستازی یونی به خوبی برقرار شده و حاکی از تحمل گیاه به این سطح تنش می باشد. نکته جالب توجه دیگر اینکه با توجه به ثابت شدن K^+/Na^+ ، هموستازی حتی در سطح $6/9 \text{ dSm}^{-1}$ نیز در روزهای انتهایی اعمال تنش برقرار شده است.

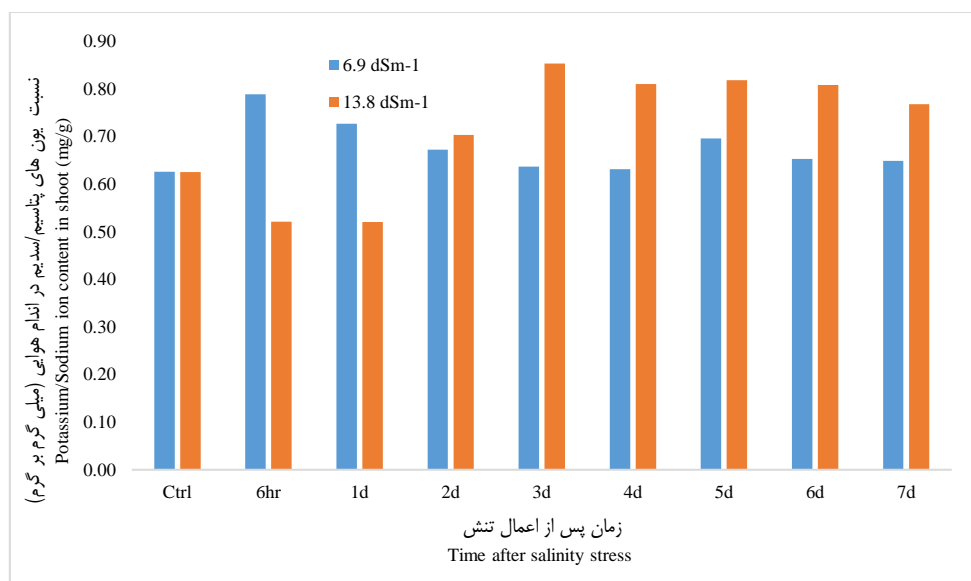
تالوار و همکاران (Talwar *et al.*, 2011) جهت به گزینی ژنوتیپ های متحمل به شوری در یولاف، نتیجه گیری کردند که



شکل ۱- میزان تجمع یون سدیم (Na⁺) تحت تیمار تنش شوری در سطوح ۶/۹ dSm⁻¹ و ۱۳/۸ dSm⁻¹ و ۹ زمان نمونه‌برداری
 Figure 1. The amount of sodium ion (Na⁺) accumulation under salt stress (6.9 dSm⁻¹ and 13.8 dSm⁻¹) and 9 sampling times



شکل ۲- میزان تجمع یون پتاسیم (K⁺) تحت تیمار تنش شوری در سطح ۶/۹ dSm⁻¹ و ۱۳/۸ dSm⁻¹ و ۹ زمان نمونه‌برداری
 Figure 2. The amount of potassium ion (K⁺) accumulation under salt stress (6.9 dSm⁻¹ and 13.8 dSm⁻¹) and 9 sampling times



شکل ۳- نسبت تجمع پتاسیم به سدیم (K^+/Na^+) تحت تیمار تنش شوری در سطح $6/9$ dSm^{-1} و $13/8$ dSm^{-1} و ۹ زمان نمونه برداری (تفاوت معنی داری بین سطوح مختلف تنش و زمان های اعمال تنش وجود نداشت)

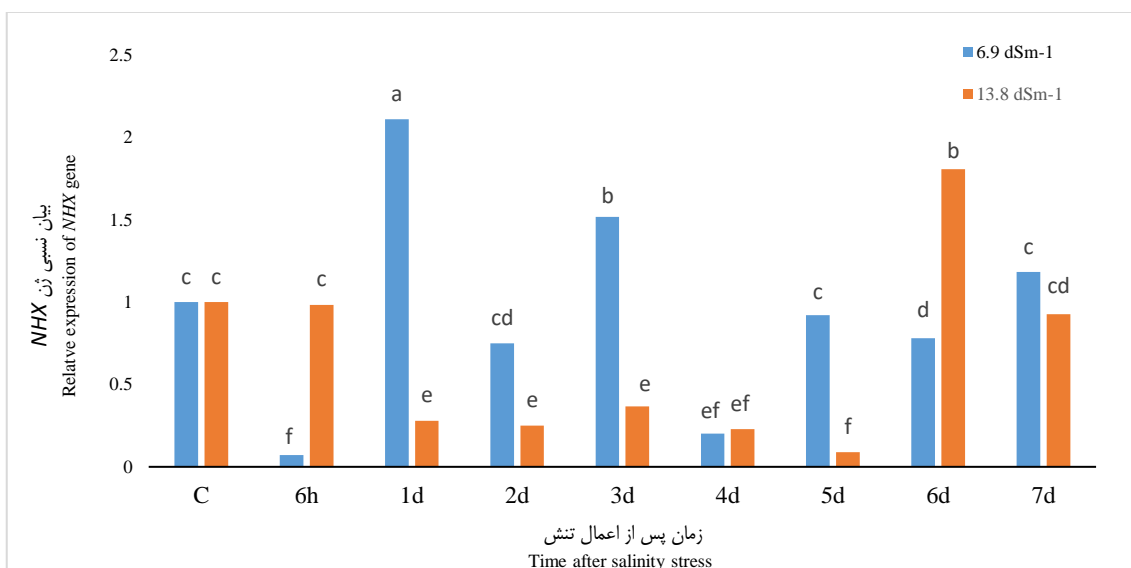
Figure 3. The ratio of potassium to sodium ion (K^+/Na^+) accumulation under salt stress (6.9 dSm^{-1} and 13.8 dSm^{-1}) and 9 sampling times. (No significant differences between levels and times of salinity stress)

کاهش هر چند در روز چهارم نسبت به شاهد معنی دار نبود که با احتمال بالا، دلیل این کاهش را می توان در توان بالای این گیاه برای برقراری تعادل یونی سریع در گیاه دانست.

در مطالعه ای که بر روی گیاهان آراییدوپسیس، برنج، باقلا و گوجه فرنگی انجام گرفت، افزایش بیان ژن *NHX* پس از اعمال تنش گزارش شده است (Gaxiola et al., 1998; Hamada, 2001; Zahran et al., 2007) همچنین مطالعه دیگری بر روی ژن های *NHX* کینوا صورت گرفت که نشان داد اکثر ژن های *NHX* با افزایش روزهای تنش بیان معنی داری را نسبت به شاهد نشان دادند (Zhang et al., 2022). در مطالعه مشابه دیگری که سعیدپور و همکاران (Saeid Pour et al., 2015) انجام دادند گزارش نمودند که میزان بیان ژن *NHX* در گیاه گلرنگ شش، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال تنش، افزایش چشمگیری نسبت به گیاه شاهد داشت. همچنین در تمام زمان های بررسی شده، با افزایش میزان نمک، بیان ژن مذکور کاهش نشان داد هر چند هنوز نسبت به شاهد، افزایش بیان دیده می شد. مطالعه حاضر و مطالعات انجام شده حاکی از اهمیت ژن آنتی پورتر غشا واکوئلی در مکانیسم تحمل به نمک در گیاهان به خصوص در کینوا می باشد.

بررسی بیان ژن *NHX*

در گیاهان سازوکار مهمی در جابجایی Na^+ سیتوسولی و کاهش اثرات سمی آن وجود دارد که باعث انتقال مقادیر اضافی یون های سدیم در واکوئل ها یا بافت هایی با حساسیت کمتر می شود و این کار به وسیله فعالیت گروه آنتی پورترهای Na^+/H^+ مربوط به زیرخانواده *IC-NHE/NHX* که در تونوپلاست قرار دارند، انجام می شود. ژن های *NHX*، آنتی پورتر Na^+/H^+ واکوئلی را رمز می کنند که جابجایی Na^+ به واسطه H^+ از عرض غشای واکوئلی و تجمع Na^+ در واکوئل ها را کتالیز می کند (Nass et al., 1997). همان طور که در شکل ۴ مشاهده می شود، میزان بیان ژن *NHX* یک روز پس از اعمال تنش، نسبت به شاهد افزایش چشمگیری در سطح $6/9$ dSm^{-1} داشت به طوری که بیشترین میزان بیان ژن مربوط به همین تیمار بود. در تیمار دو روز پس از تنش، بیان این ژن افزایش نشان داد. از روز سوم پس از اعمال تنش شوری، میزان بیان ژن *NHX*، افزایش یا کاهش معنی داری نسبت به شاهد نداشت. در غلظت $13/8$ dSm^{-1} ، تیمارهای زمانی شش ساعت، یک و دو روز نسبت به شاهد افزایش بیان را نشان دادند اما در تیمارهای زمانی سه روز پس از اعمال تنش شوری، سطح رونوشت ژن *NHX* کاهش یافت. این



شکل ۴- بررسی تغییرات بیان نسبی ژن *NHX* برگ در غلظت $6/9 \text{ dSm}^{-1}$ و $13/8 \text{ dSm}^{-1}$ شوری و ۹ زمان نمونه‌برداری (میانگین‌های دارای حروف انگلیسی مشابه در هر سطح تیمار شوری، تفاوت آماری معنی‌داری ندارند)

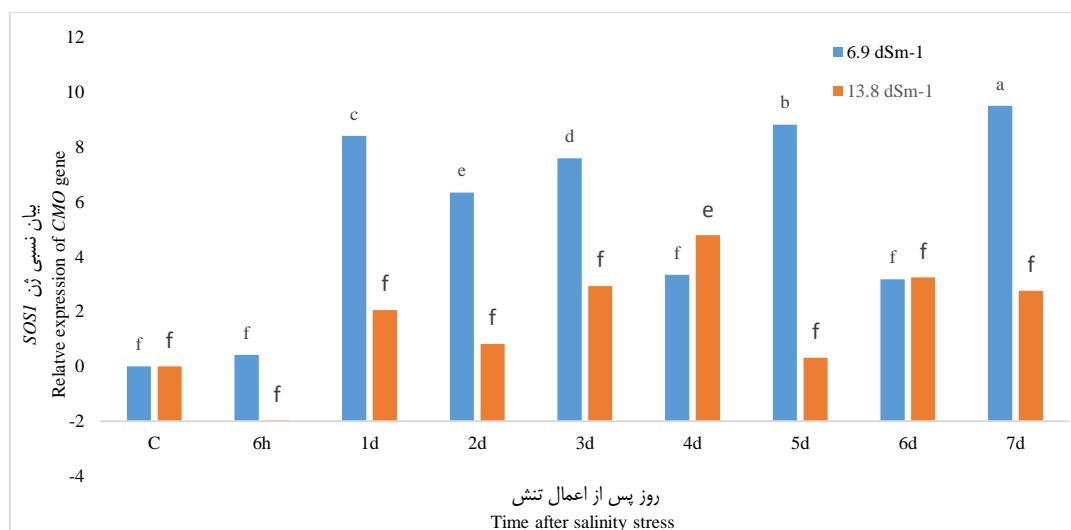
Figure 4. Changes in the relative expression of *NHX* gene in 6.9 dSm^{-1} and 13.8 dSm^{-1} concentration salinity and 9 sampling times (Means with same letters in each salinity level don't have significant differences)

ژن *SOS1* حاکی از آن است که تحت تنش شوری، گیاهان غلظت‌های بالای یون پتاسیم و غلظت‌های پایین یون سدیم در سیتوسول را با تنظیم بیان و فعالیت ترانسپورترهای سدیم و پتاسیم و پمپ‌های یون پروتون که نیروی محرک پروتونی موردنیاز برای فرایندهای انتقال تولید می‌کند، حفظ می‌نمایند (Zhu, 2003). بررسی همزمان بیان این ژن در تیمارهای $6/9 \text{ dSm}^{-1}$ و $13/8 \text{ dSm}^{-1}$ شوری نشان داد که با افزایش میزان غلظت از $6/9 \text{ dSm}^{-1}$ به $13/8 \text{ dSm}^{-1}$ ، میزان بیان ژن کاهش نشان داد اما در هر دو غلظت نسبت به شاهد، افزایش بیان ملاحظه شد. دلیل این کاهش از $6/9 \text{ dSm}^{-1}$ به $13/8 \text{ dSm}^{-1}$ احتمالاً خروج یون سدیم از مسیرهای دیگری همچون ژن‌های *HKT* (High-affinity potassium transporter) و یا مسیرهای دیگری می‌باشد که بررسی تغییر در بیان این ژن‌ها به دلیل ناشناخته بودن توالی آنها در گیاه کینوا نیاز به بررسی‌های بیشتر و استفاده از توالی ژن‌های مشابه در گونه‌های خویشاوند دارد. در مطالعه مشابهی در گیاهان گندم که در معرض ۲۰۰ میلی مولار کلرید سدیم قرار گرفته بودند، سطح بیان ژن *TaSOS1* پس از سه ساعت تنش شوری ریشه، به بیشترین مقدار خود (حدود پنج برابر شاهد) رسید و پس از آن در تمامی ساعات و روزها به حالت عادی خود بازگشت (Xu et al., 2008). از طرفی طبق گزارشات به‌دست‌آمده، گیاه به‌واسطه آنتی‌پورترهای موجود در غشاهای پلاسمایی از طریق سازوکار افزایش بیان ژن‌های کلیدی MAP کینازی استفاده کرده تا هم از مصرف بیش از حد ATP جلوگیری کند و هم اثرات سوء ROSها را کنترل نماید (Hosseini et al., 2023).

بررسی بیان ژن *SOS1*

فرایندهای انتقالی که خروج یون از سلول را تنظیم می‌نمایند در کاهش تجمع سدیم در سیتوسول گیاهی نقش حیاتی دارند. در گیاهان عالی دفع سدیم از سیتوسول به‌واسطه آنتی‌پورترهای موجود در غشاهای پلاسمایی (*SOS1*) انجام می‌شود (Zhu, 2003). اثرات تنش شوری بر روی بیان ژن *SOS1* در برگ و در غلظت $6/9 \text{ dSm}^{-1}$ شوری، نشان داد که بیان ژن روند صعودی را در تمامی تیمارها نسبت به شاهد داشت، به‌طوری‌که بیشترین میزان چشمگیر سطح رونوشت *SOS1* مربوط به تیمارهای روز اول، سوم، پنجم و هفتم بود. اما بیان این ژن در چهار و شش روز پس از اعمال تنش به‌حالت معمول خود نسبت به سایر تیمارها بازگشت (شکل ۵). در واقع سلول در بیان ژن *SOS1* روند دونمایی (bimodal) در پیش گرفته و بسته به میزان تجمع یون سدیم در داخل سیتوسول، نسبت به خروج آن و برقراری تعادل یونی تلاش می‌نماید (Zhu, 2003). مطالعات انجام شده نشان داد، بیش بیان آنتی‌پورتر سدیم/پروتون غشای پلاسمایی *AtSOS1* گیاه آراییدوپسیس، تحمل به شوری را در گیاهان تراریخته به‌دنبال داشت (Shi et al., 2003).

در غلظت $13/8 \text{ dSm}^{-1}$ شوری، در روز اول پس از تنش، میزان بیان این ژن نسبت به شاهد افزایش نشان داد، هرچند بیشترین بیان این ژن در سطح $13/8 \text{ dSm}^{-1}$ شوری آب دریا در روز چهارم مشاهده شد (شکل ۵). پس از یک روز کاهش در بیان این ژن، مجدداً در روزهای ششم و هفتم، افزایش بیان نسبت به شاهد مشاهده شد. به‌نظر می‌رسد این موضوع منعکس‌کننده نقش کلیدی آنتی‌پورترهای سدیم/پروتون در تحمل به شوری باشد. روند دونمایی کاهش و افزایش بیان



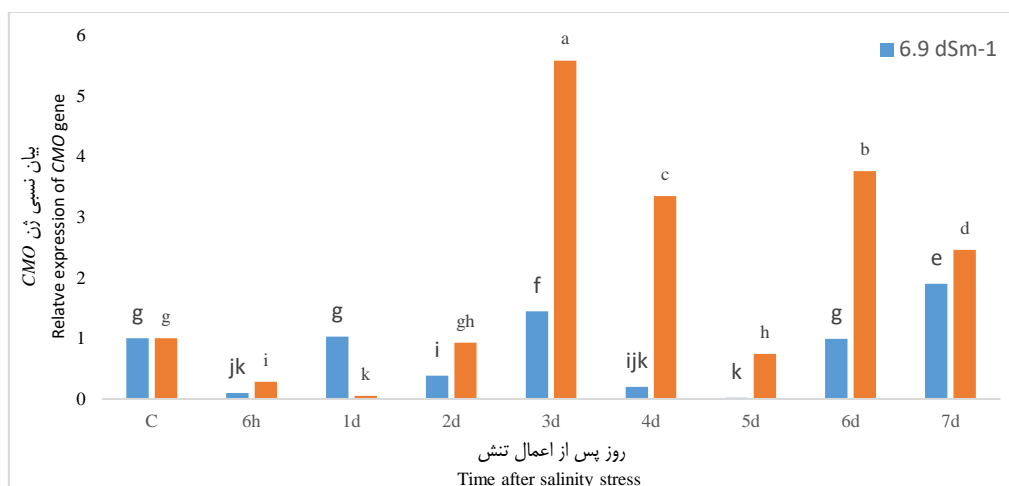
شکل ۵- بررسی تغییرات بیان نسبی ژن *SOS1* در غلظت 6.9 dSm^{-1} و 13.8 dSm^{-1} شوری و ۹ زمان نمونه‌برداری (میانگین‌های دارای حروف انگلیسی مشابه، تفاوت آماری معنی‌داری ندارند)

Figure 5. Changes in the relative expression of *SOS1* gene in 6.9 dSm^{-1} and 13.8 dSm^{-1} concentration salinity and 9 sampling times (Means with same letters don't have significantly differences)

آنزیم بتائین آلدهید دهیدروژناز (*BADH*) است. گلایسین بتائین با بحران تنش در گیاه ظاهر و به‌عنوان یک محلول تنظیم مؤثر در گیاهان محسوب می‌شود و با رشد گیاهان در محیط‌های خشک همبستگی بالایی دارد (Hanson *et al.*, 1985). طبق نتایج به‌دست آمده از بیان ژن *BADH* (شکل ۷)، میزان بیان این ژن در غلظت 6.9 dSm^{-1} شوری در روزهای اول تا سوم نسبت به شاهد افزایش چشمگیری نشان داد، به‌طوری‌که بیشترین میزان بیان در روز اول پس از تنش مشاهده شد که این مشاهده با نتایج به‌دست آمده در همین غلظت از بیان ژن *CMO* همخوانی دارد. براساس مطالعه نمودار، گیاه طی روزهای چهارم تا ششم سعی نموده از این حداکثر بیان *BADH* در روزهای ابتدایی، برای پیمودن مسیر تولید گلیسین بتائین استفاده نماید. اما بررسی همزمان تغییرات بیان این دو ژن *CMO* و *BADH* نشان داد که گیاه در روز هفتم در پاسخ به درک تنش و پیرو بیان بالای ژن *CMO*، نیاز به بیان *BADH* بیشتری نسبت به روزهای قبل داشته است. در غلظت 13.8 dSm^{-1} شوری، بیشترین بیان ژن *BADH* مربوط به تیمار سه روز و چهار روز می‌باشد، به‌طوری‌که این افزایش بیان در سه و چهار روز *CMO* نیز مشاهده می‌شود. در واقع گیاه حسب نیاز به پاسخ تنش شوری، توسط آنزیم *CMO*، کولین را به بتائین آلدهید و بتائین آلدهید را توسط آنزیم *BADH*، به گلایسین بتائین تبدیل می‌نماید. در چغندر قند با افزایش سطح تنش، سطح رونوشت برداری از mRNA ژن *BADH* تحت تنش شوری هم در ریشه و هم در برگ افزایش نشان داد (Ishitani *et al.*, 1995). همچنین بر اساس مطالعات ناکومارا و همکاران (Nakamura *et al.*, 2001)، تنش خشکی و شوری در گیاه جو، موجب افزایش بیان ژن *BADH* می‌شود. علاوه بر این، در کینوا، تنش NaCl منجر به افزایش سطوح رونوشت *CqBADH* همراه با تجمع گلیسین بتائین شد (Jiang *et al.*, 2016).

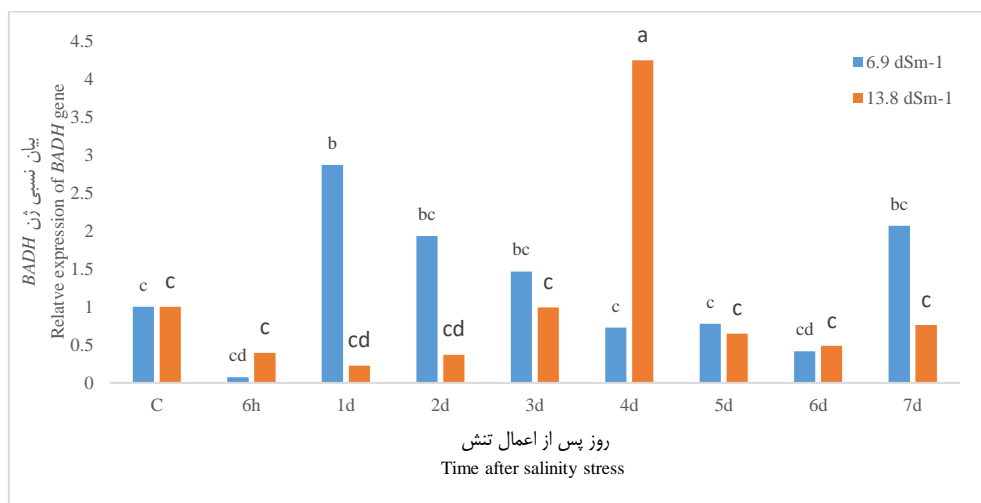
بررسی بیان ژن‌های دخیل در مسیر سنتز گلایسین بتائین (*BADH* و *CMO*)

گلایسین بتائین $(\text{CH}_3)_3\text{N}+\text{CH}_2\text{COO}$ معمول‌ترین محلول آلی سازگار می‌باشد که در میکروارگانیزم‌های مختلف، گیاهان عالی و حیوانات وجود داشته و از بین بسیاری از ترکیبات آمونیوم چهارگانه شناخته شده بیشترین فراوان‌ترین ترکیب در پاسخ به تنش خشکی و شوری در گیاهان می‌باشد (Mohanty *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2003). در بررسی اولین ژن دخیل در مسیر تولید گلایسین بتائین، کولین مونوکسیژناز (*CMO*)، میزان بیان این ژن شش ساعت پس از اعمال تنش، در هر دو غلظت نسبت به شاهد کاهش داشت. اما با افزایش روزهای تنش، این میزان روند صعودی به خود گرفت، به‌طوری‌که در روز هفتم سطح شوری 6.9 dSm^{-1} ، میزان این بیان به حداکثر مقدار خود رسید و در غلظت 13.8 dSm^{-1} این حداکثر مربوط به روز سوم تنش بود. نظر به اینکه تنش اعمال شده از طریق ریشه صورت گرفته، احتمال می‌رود در تیمار شش ساعت، این میزان تنش، توسط برگ هنوز درک نشده باشد اما افزایش میزان بیان در غلظت 6.9 dSm^{-1} شوری در روز اول و در 13.8 dSm^{-1} ، در روز سوم که برگ این سیگنال را دریافت نمود، مشاهده شد. به‌طور کلی وقتی گیاه در معرض شوری قرار می‌گیرد، به‌مقدار محدود از ژن *CMO* رونویسی می‌نماید اما افزایش ساعات تنش، منجر به افزایش بیان این ژن خواهد شد. بدیهی است میزان این بیان در روزهای آتی تنش شوری، بیشتر از تیمار شاهد و تیمارهای ساعات اولیه تنش باشد (شکل ۶). این مطلب همچنین در بررسی همزمان غلظت‌های 6.9 dSm^{-1} و 13.8 dSm^{-1} قابل مشاهده است. هایاشی و همکاران (Hayashi *et al.*, 1998). گزارش نمودند در آراییدوپسیس تالیانا در شرایط تنش، گلایسین بتائین در کلروپلاست تجمع پیدا کرد و همبستگی مثبت با افزایش رونوشت ژن *CMO* داشت. مرحله نهایی سنتز گلایسین بتائین به‌عهد ژن مربوط به



شکل ۶- بررسی تغییرات بیان نسبی ژن *CMO* در غلظت 6.9 dSm^{-1} و 13.8 dSm^{-1} شوری و ۹ زمان نمونه‌برداری (میانگین‌های دارای حروف انگلیسی مشابه، تفاوت آماری معنی‌داری ندارند)

Figure 6. Changes in the relative expression of *CMO* gene in 6.9 dSm^{-1} and 13.8 dSm^{-1} concentration salinity and 9 sampling times (Means with same letters don't have significantly differences)



شکل ۷- بررسی تغییرات بیان نسبی ژن *BADH* در غلظت 6.9 dSm^{-1} و 13.8 dSm^{-1} شوری و ۹ زمان نمونه‌برداری (میانگین‌های دارای حروف انگلیسی مشابه، تفاوت آماری معنی‌داری ندارند)

Figure 7. Changes in the relative expression of *BADH* gene in 6.9 dSm^{-1} and 13.8 dSm^{-1} concentration salinity and 9 sampling times (Means with same letters don't have significantly differences)

میزان بیان *SOS1* در روز اول پس از تنش نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری را داشته است. این بدین معناست که با فعال شدن *SOS1*، گیاه مسیر دومی را جهت برقراری تحمل و هموستازی سلولی از طریق خروج سدیم به منطقه ریشه، ذخیره سدیم در واکوئل و جلوگیری از تجمع آن در سیتوپلاسم و کنترل انتقال سدیم در مسیرهای طولانی بین ریشه و برگ‌ها و بارگیری سدیم از آوند چوب را انتخاب نموده است که البته این مسیر احتمالاً برخلاف مسیر ژن *NHX1* نیاز به صرف انرژی بالایی ندارد. تا روز سوم گیاه با استفاده از این دو مسیر تلاش نموده تا از بروز حساسیت به تنش جلوگیری نماید اما در روز سوم و همزمان با افزایش معنی‌دار یون سدیم درون سیتوسول، میزان بیان ژن *CMO* نیز افزایش پیدا کرده که نشان می‌دهد گیاه سعی کرده با تولید اسمولیت‌های

نتیجه‌گیری کلی

بررسی‌های این مطالعه نشان می‌دهد بعد از ورود یون سدیم به درون سیتوسول و دریافت سیگنال تنش، بیان ژن *NHX1* به‌طور چشمگیری افزایش معنی‌داری یافت، یعنی گیاه با این افزایش بیان، سعی نموده تا با کده‌بندی یون سدیم در واکوئل از اثرات ناشی از تنش بکاهد که البته با مصرف انرژی (*ATP*) نیز همراه خواهد بود. در روز اول، پیام افزایش در میزان کلسیم سیتوپلاسمی نیز دریافت می‌شود که سیگنال دریافتی آن هنوز به‌طور کامل شناخته نشده است. هرچند میل ترکیبی *SOS3* با کلسیم پایین است، اما تحت تنش با افزایش کلسیم سیتوسولی، *SOS3* با کلسیم ترکیب و فعال می‌شود سپس ترکیب *SOS3* با *SOS2* موجب فعال شدن *SOS1* می‌شود. مسیر *SOS* تنها توسط تنش شوری فعال می‌شود. بر اساس نتایج به‌دست آمده،

باتوجه به مطالعات آگاریه و همکاران (Agarie *et al.*, 2007) در مورد حضور گسترده سلول‌های کیسه اپیدرمی (EBC) در گیاه کینوا که بر روی سطوح اندام هوایی، نقشی مشابه نقش واکوئل در درون سلول را ایفا می‌کنند، یون سدیم دفع شده از سلول، با استفاده از ژن *NHX* یا ژن دیگری که به خوبی شناخته نشده است به درون این کیسه‌های نمکی هدایت شده و به این روش گیاه یون سدیم را از محیط سیتوسول خود دفع نموده است.

گلابیسین بتائین و البته مسیر پرولین تعادل اسمزی در سلول را حفظ کند. اما نکته جالب توجه اینکه سلول برای حفظ تعادل یونی، ساده‌ترین راه که افزایش جذب پتاسیم و ثبات نسبت K^+/Na^+ هست هم نادیده نگرفته است و از این طریق نیز تلاش نموده تا اثرات مخرب ناشی از تنش را بکاهد. کما اینکه از روز چهارم به بعد نمودار K^+/Na^+ روند ثابتی را در تعادل این دو یون نشان می‌دهد. اما در پاسخ به دلیل افزایش بیان ژن‌های *SOS1* و *NHX* در روز هفتم، احتمالاً سلول سعی نموده از طریق بارگیری یون سدیم در آوند چوبی با استفاده از آنتی‌پورترهای *SOS1*، این یون را از طریق اندام‌های هوایی دفع نماید. چراکه

References

- Adolf, V. I., Jacobsen, S. E., Shabala, S. J., & Botany, E. (2013). Salt tolerance mechanisms in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.), 92, 43-54.
- Agarie, S., Shimoda, T., Shimizu, Y., Baumann, K., Sunagawa, H., Kondo, A., ... & Cushman, J. C. (2007). Salt tolerance, salt accumulation, and ionic homeostasis in an epidermal bladder-cell-less mutant of the common ice plant *Mesembryanthemum crystallinum*. *Journal of Experimental Botany*, 58(8), 1957-1967.
- Apse, M. P., & Blumwald, E. (2007). Na^+ transport in plants. *FEBS letters*, 581(12), 2247-2254.
- Archangi, A., Khodambashi, M., & Mohammadkhani, A. (2012). The effect of salt stress on morphological characteristics and Na^+ , K^+ and Ca^+ ion contents in medicinal plant fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.) under hydroponic culture. 20123294104
- Ashraf, M., & McNeilly, T. (2004). Salinity tolerance in Brassica oilseeds. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 23(2), 157-174.
- Ashraf, M., Nazir, N., & McNeilly, T. (2001). Comparative salt tolerance of amphidiploid and diploid Brassica species. *Plant Science*, 160(4), 683-689.
- Berthomieu, P., Conéjéro, G., Nublat, A., Brackenbury, W. J., Lambert, C., Savio, C., ... & Casse, F. (2003). Functional analysis of AtHKT1 in Arabidopsis shows that Na^+ recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. *The EMBO Journal*.
- Bybordi, A., & Tabatabaei, J. (2009). Effect of salinity stress on germination and seedling properties in canola cultivars (*Brassica napus* L.). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 37(2), 71-76.
- Dini, I., Tenore, G. C., Trimarco, E., & Dini, A. (2006). Two novel betaine derivatives from *Kancolla* seeds (*Chenopodiaceae*). *Food Chemistry*, 98(2), 209-213.
- El-Hendawy, S. E., Ruan, Y., Hu, Y., & Schmidhalter, U. (2009). A comparison of screening criteria for salt tolerance in wheat under field and controlled environmental conditions. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 195(5), 356-367.
- Gaxiola, R. A., Yuan, D. S., Klausner, R. D., & Fink, G. R. (1998). The yeast CLC chloride channel functions in cation homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(7), 4046-4050.
- Hamada, A., Hibino, T., Nakamura, E., & Takabe, T. (2001). Na^+/H^+ antiporter from *Synechocystis* species PCC 6803, homologous to SOS1, contains an aspartic residue and long C-terminal tail important for the carrier activity. *Plant Physiology*, 125(1), 437-446.
- Han, H., Qu, Y., Wang, Y., Zhang, Z., Geng, Y., Li, Y., ... & Ma, C. (2023). Transcriptome and small rna sequencing reveals the basis of response to salinity, alkalinity and hypertonia in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *International Journal of Molecular Sciences*, 24(14), 11789.
- Hanson, A. D., May, A. M., Grumet, R., Bode, J., Jamieson, G. C., & Rhodes, D. (1985). Betaine synthesis in chenopods: localization in chloroplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(11), 3678-3682.
- Hariadi, Y., Marandon, K., Tian, Y., Jacobsen, S. E., & Shabala, S. (2011). Ionic and osmotic relations in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) plants grown at various salinity levels. *Journal of Experimental Botany*, 62(1), 185-193.
- Hayashi, H., Alia, Sakamoto, A., Nonaka, H., Chen, T. H., & Murata, N. (1998). Enhanced germination under high-salt conditions of seeds of transgenic Arabidopsis with a bacterial gene (*codA*) for choline oxidase. *Journal of Plant Research*, 111, 357-362.
- Hinojosa, L., González, J. A., Barrios-Masias, F. H., Fuentes, F., & Murphy, K. M. (2018). Quinoa abiotic stress responses: A review. *Plants*, 7(4), 106.
- Hosseini, S. S., Ramezani, S. S., Soltanloo, H., & Seifati, S. E. (2023). RNA-seq analysis and reconstruction of gene networks involved in response to salinity stress in quinoa (cv. Titicaca). *Scientific Reports*, 13(1), 7308.
- Ishitani, M., Nakamura, T., Han, S. Y., & Takabe, T. (1995). Expression of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in barley in response to osmotic stress and abscisic acid. *Plant Molecular Biology*, 27, 307-315.

- Jacobsen, S. E., Liu, F., & Jensen, C. R. (2009). Does root-sourced ABA play a role for regulation of stomata under drought in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Scientia Horticulturae*, 122(2), 281-287.
- Jacobsen, S. E., Monteros, C., Corcuera, L. J., Bravo, L. A., Christiansen, J. L., & Mujica, A. (2007). Frost resistance mechanisms in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *European Journal of Agronomy*, 26(4), 471-475.
- Jacobsen, S. E. (2003). The worldwide potential for quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Food Reviews International*, 19(1-2), 167-177.
- J Jacobsen, S. E., Jensen, C. R., & Pedersen, H. (2005). Use of the relative vegetation index for growth estimation in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *J Food Agric Environ*, 3, 169-175.
- Jarvis, D. E., Ho, Y. S., Lightfoot, D. J., Schmöckel, S. M., Li, B., Borm, T. J., ... & Tester, M. (2017). The genome of *Chenopodium quinoa*. *Nature*, 542(7641), 307-312.
- Jiang, W., Li, C., Li, L., Li, Y., Wang, Z., Yu, F., ... & Zhao, C. (2022). Genome-wide analysis of CqCrRLK1L and CqRALF gene families in chenopodium quinoa and their roles in salt stress response. *Frontiers in Plant Science*, 13, 918594.
- Jiang, Y., Zhu, S., Yuan, J., Chen, G., & Lu, G. (2016). A betaine aldehyde dehydrogenase gene in quinoa (*Chenopodium quinoa*): structure, phylogeny, and expression pattern. *Genes & Genomics*, 38, 1013-1020.
- Khorshid, A., Asadi, A. A. & Rajabi, A. 2021. Determination of Genetic Parameters of Quantitative and Qualitative Traits of Sugar Beet in Drought and Normal Conditions. *Journal of Crop Breeding*, 13(40), 151-161 doi:10.52547/jcb.13.40.151. [In Persian]
- Leidi, E. O., Barragán, V., Rubio, L., El-Hamdaoui, A., Ruiz, M. T., Cubero, B., ... & Pardo, J. M. (2010). The AtNHX1 exchanger mediates potassium compartmentation in vacuoles of transgenic tomato. *The Plant Journal*, 61(3), 495-506.
- Li, Z., Hansen, J. L., Liu, Y., Zemetra, R. S., & Berger, P. H. (2004). Using real-time PCR to determine transgene copy number in wheat. *Plant Molecular Biology Reporter*, 22, 179-188.
- Liu, M., Pan, T., Allakhverdiev, S. I., Yu, M., & Shabala, S. (2020). Crop halophytism: an environmentally sustainable solution for global food security. *Trends in Plant Science*, 25(7), 630-634.
- Maughan, P. J., Turner, T. B., Coleman, C. E., Elzinga, D. B., Jellen, E. N., Morales, J. A., ... & Bonifacio, A. (2009). Characterization of Salt Overly Sensitive 1 (SOS1) gene homoeologs in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Genome*, 52(7), 647-657.
- Mishra, A., & Tanna, B. (2017). Halophytes: potential resources for salt stress tolerance genes and promoters. *Frontiers in Plant Science*, 8, 829.
- Mohanty, A., Kathuria, H., Ferjani, A., Sakamoto, A., Mohanty, P., Murata, N., & Tyagi, A. (2002). Transgenics of an elite indica rice variety Pusa Basmati 1 harbouring the codA gene are highly tolerant to salt stress. *Theoretical and Applied Genetics*, 106, 51-57.
- Moog, M. W., Trinh, M. D. L., Nørrevang, A. F., Bendtsen, A. K., Wang, C., Østerberg, J. T., ... & Palmgren, M. (2022). The epidermal bladder cell-free mutant of the salt-tolerant quinoa challenges our understanding of halophyte crop salinity tolerance. *New Phytologist*, 236(4), 1409-1421.
- Morales, A. J., Bajgain, P., Garver, Z., Maughan, P. J., & Udall, J. A. (2011). Physiological responses of *Chenopodium quinoa* to salt stress. *Int. J. Plant Physiol. Biochem*, 3, 219-232.
- Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59(1), 651-681.
- Nakamura, T., Nomura, M., Mori, H., Jagendorf, A. T., Ueda, A., & Takabe, T. (2001). An isozyme of betaine aldehyde dehydrogenase in barley. *Plant and Cell Physiology*, 42(10), 1088-1092.
- Nass, R., Cunningham, K. W., & Rao, R. (1997). Intracellular sequestration of sodium by a novel Na⁺/H⁺ exchanger in yeast is enhanced by mutations in the plasma membrane H⁺-ATPase: insights into mechanisms of sodium tolerance. *Journal of Biological Chemistry*, 272(42), 26145-26152.
- Poustini, K., & Siosemardeh, A. (2004). Ion distribution in wheat cultivars in response to salinity stress. *Field crops research*, 85(2-3), 125-133.
- Pulvento, C., Riccardi, M., Lavini, A., Iafelice, G., Marconi, E., & d'Andria, R. (2012). Yield and quality characteristics of quinoa grown in open field under different saline and non-saline irrigation regimes. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 198(4), 254-263.
- Quinoa, F. A. O. (2011). An ancient crop to contribute to world food security. *Regional Office for Latin America and the Caribbean*, 2, 73-87.
- Ravari, S. Z., Dehghani, H., & Naghavi, H. (2016). Assessing salinity tolerance of bread wheat varieties using tolerance indices based on K⁺/Na⁺ ratio of flag leaf. *Cereal Research*, 6(2), 133-144.
- Riccardi, M., Pulvento, C., Lavini, A., d'Andria, R., & Jacobsen, S. E. (2014). Growth and ionic content of quinoa under saline irrigation. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 200(4), 246-260.
- Rosa, M., Hilal, M., Gonzalez, J. A., & Prado, F. E. (2009). Low-temperature effect on enzyme activities involved in sucrose-starch partitioning in salt-stressed and salt-acclimated cotyledons of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(4), 300-307.
- Ruiz-Carrasco, K., Antognoni, F., Coulibaly, A. K., Lizardi, S., Covarrubias, A., Martínez, E. A., ... & Zurita-Silva, A. (2011). Variation in salinity tolerance of four lowland genotypes of quinoa

- (*Chenopodium quinoa* Willd.) as assessed by growth, physiological traits, and sodium transporter gene expression. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49(11), 1333-1341.
- Ruiz, K. B., Biondi, S., Martínez, E. A., Orsini, F., Antognoni, F., & Jacobsen, S. E. (2016). Quinoa—a model crop for understanding salt-tolerance mechanisms in halophytes. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 150(2), 357-371.
- Ruiz, K. B., Rapparini, F., Bertazza, G., Silva, H., Torrigiani, P., & Biondi, S. (2017). Comparing salt-induced responses at the transcript level in a salares and coastal-lowlands landrace of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). *Environmental and Experimental Botany*, 139, 127-142.
- Saeid Pour, A., Kavousi, H. R., Mohammadi Nezhad, Q., & Khosravi, S. (2015). Gene Expression Analysis of NHX to Salinity stress in Safflower (*Carthamustinctorius* L.). *Journal of Agricultural Biotechnology*, 6(4), 91-99. [In Persian]
- Sakamoto, A., & Murata, N. (2000). Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in plants: current status and implications for enhancement of stress tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 51(342), 81-88.
- Seifati, S. E., Ramezanzpour, S. S., Soltanloo, H., Salehi, M. & Sepahvand, N. A. J.C.P (2015). Study on Some Morphophenological Traits Related to Yield and Early Maturity in Quinoa Cultivars (*Chenopodium quinoa*, Willd.). *Journal of Crop Production*, 8(2), 153-169. [In Persian].
- Shakib Aylar, A., Farzaneh, S., Moharramnejad, S., Seyed Sharifi, R., & Hasanzadeh, M. (2021). Response of Some Physiological Traits in Maize Cultivars to Salinity Stress. *Journal of Crop Breeding*, 13(40), 173-180 [In Persian].
- Shi, H., Lee, B. H., Wu, S. J., & Zhu, J. K. (2003). Overexpression of a plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Biotechnology*, 21(1), 81-85.
- Sun, Y., Liu, F., Bendevis, M., Shabala, S., & Jacobsen, S. E. (2014). Sensitivity of two quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) varieties to progressive drought stress. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 200(1), 12-23.
- Talwar, H. S., Kumari, A., Surwenshi, A., & Seetharama, N. (2011). Sodium: potassium ratio in foliage as an indicator of tolerance to chloride-dominant soil salinity in oat (*Avena sativa*). *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 81(5), 481.
- Tuteja, N. (2007). Mechanisms of high salinity tolerance in plants. *Methods in enzymology*, 428, 419-438.
- Xiong, L., Schumaker, K. S., & Zhu, J. K. (2002). Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *The Plant Cell*, 14(suppl_1), S165-S183.
- 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.
- Yang, W. J., Rich, P. J., Axtell, J. D., Wood, K. V., Bonham, C. C., Ejeta, G., ... & Rhodes, D. (2003). Genotypic variation for glycinebetaine in sorghum. *Crop Science*, 43(1), 162-169.
- Zahran, H. H., Marín-Manzano, M. C., Sánchez-Raya, A. J., Bedmar, E. J., Venema, K., & Rodríguez-Rosales, M. P. (2007). Effect of salt stress on the expression of NHX-type ion transporters in *Medicago intertexta* and *Melilotus indicus* plants. *Physiologia Plantarum*, 131(1), 122-130.
- Zaman, M., Shahid, S. A., & Heng, L. (2018). *Guideline for salinity assessment, mitigation and adaptation using nuclear and related techniques* (p. 164). Springer Nature.
- Zangishei, Z., & Salari, H. (2016). Monitoring the expression pattern of GeNES coding betaine aldehyde dehydrogenase (BADH) enzymes in *Arabidopsis* under drought stress. *Modern Genetics Journal*, 11(3), 349-356. [In Persian].
- Zhang, Y. M., Zhu, L. L., & Chen, Z. G. (2022). Identification and expression analysis of NHX gene family in quinoa under salt stress. *Biotechnology Bulletin*, 38(12), 184.
- Zhu, J. K. (2003). Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(5), 441-445.