



تحقیقات غلات

دوره نهم / شماره اول / بهار ۱۳۹۸ (۲۶-۱۷)

افزایش بیان ژن‌های رمزکننده آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و فنیل آلانین آمونیلیاز و فاکتور رونویسی *bZIP33* تحت شرایط کمبود روی در گندم نان (*Triticum aestivum* L.)

فاطمه محمودی ملحم^۱ و بابک عبدالهی مندولکانی^{۲*}

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۳/۱۳

چکیده

به منظور بررسی اثر تنش کمبود روی (Zn) بر بیان ژن‌های رمزکننده آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و فنیل آلانین آمونیلیاز و فاکتور رونویسی *bZIP33* در ارقام روی-کارا و روی-ناکارا، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه اجرا شد. ارقام بیات (روی-کارا) و هیرمند (روی-ناکارا) در شرایط کمبود روی خاک و کفایت آن کشت و بیان نسبی ژن‌های مورد نظر در برگ و ریشه ارقام در دو مرحله، یک‌ماه بعد از جوانه‌زنی (دوره رویشی) و ۳۰ درصد سنبله‌دهی (دوره زایشی) با روش Real time PCR اندازه‌گیری شد. نتایج تجزیه واریانس و مقایسه میانگین تیمارها نشان داد که تحت شرایط کمبود روی، افزایش میزان بیان ژن سوپراکسید دیسموتاز در مرحله رویشی و زایشی به طور معنی‌داری در رقم روی-کارا (بیات) بیش‌تر از رقم روی-ناکارا (هیرمند) بود. بیش‌ترین میزان افزایش بیان ژن فنیل آلانین آمونیلیاز (۵۰/۵۶ برابر شاهد) در مرحله رویشی در ریشه رقم روی-کارا مشاهده شد، اما در مرحله زایشی بین ارقام روی-کارا و روی-ناکارا در هر دو اندام برگ و ریشه به لحاظ میزان بیان این ژن اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. بیان ژن رمزکننده فاکتور رونویسی *bZIP33* در برگ رقم روی-کارا تحت شرایط کمبود روی به طور معنی‌داری بیش‌تر از رقم روی-ناکارا بود، ولی اختلاف بیان این ژن در ریشه بین رقم روی-کارا و روی-ناکارا معنی‌دار نبود. بنابراین، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ژن‌های رمزکننده آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و فنیل آلانین آمونیلیاز و فاکتور رونویسی *bZIP33* (احتمالاً از طریق فعال‌سازی بیان ژن‌های ترنسپورتر روی) در تحمل تنش کمبود روی خاک در رقم روی-کارا گندم نان دخیل بودند.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، فاکتور رونویسی گروه *bZIP*، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲- دانشیار، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

* نویسنده مسئول: b.abdollahi@urmia.ac.ir

اکسیداتیو ناشی از این رادیکال‌ها دارای مکانیسم‌های آنتی اکسیدانتی آنزیمی و غیرآنزیمی هستند (Noctor and Fover, 1998; Alscher et al., 2002). برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت مهم شامل سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز هستند (Asada, 1992; Kukavica and Jovanovic, 2004). در مطالعه آسیب اکسیداتیو ناشی از کمبود روی در ریشه و برگ گندم گزارش شد که در غلظت زیاد Zn در برگ، فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز و نیز متابولیسم پرولین افزایش می‌یابد (Yue et al., 2013). گوپتا و همکاران (Gupta et al., 2011) در مطالعه تاثیر تنش کمبود روی بر گیاه ماش سیاه (*Vigna mungo* L.) نشان دادند که میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز تحت شرایط کمبود و افزایش میزان عنصر روی در خاک کاهش می‌یابد. ترکیبات فنلی نیز دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانت هستند که با جمع‌آوری و احیای گونه‌های فعال اکسیژن از اکسیداسیون مولکول‌های حیاتی زیستی سلول پیشگیری می‌کنند و مانع بروز تنش اکسیداتیو و یا تخفیف آثار آن در سلول‌های گیاه می‌شوند. فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها، تانن‌ها، هیدروکسی‌سینامیک استرها و لیگنین‌ها جزء متابولیت‌های ثانویه حاصل از مسیر بیوسنتز فنیل پروپانوئیدها هستند که در بافت‌های گیاهی به‌وفور یافت می‌شوند. آنزیم فنیل‌آلانین آمونیلایز آغازگر مسیر بیوسنتز فنیل پروپانوئیدها است که فنیل‌آلانین را با دامیناسیون به ترانس‌سینامیک اسید تبدیل می‌کند (Myung-Min et al., 2009).

فاکتورهای رونویسی (Transcription factors) نقش مهمی در تمامی فرآیندهای بیولوژیک موجودات برعهده دارند. این پروتئین‌ها معمولاً بر اساس دومین‌های متصل شونده به DNA طبقه‌بندی می‌شوند. فاکتور رونویسی bZIP دارای ناحیه‌ای است که به DNA و موتیف Leucine zipper متصل می‌شود (Jakoby et al., 2002). خانواده bZIP یکی از مهم‌ترین عوامل رونویسی است که در بیش‌تر تنش‌ها دخیل هستند و باعث کنترل بیان تعداد زیادی ژن دخیل در تنش می‌شوند (Hwang et al., 2014). این خانواده به‌عنوان یک عامل پیام‌رسان وابسته به هورمون آبسزیک اسید در گیاه آرابیدوپسیس شناخته شده است (Alves et al., 2013). بررسی اهمیت گروه F فاکتور رونویسی bZIP و ژن‌های ZIP در پاسخ به

گندم نان (*Triticum aestivum* L.) گیاهی است که در محیط‌های مختلف در سراسر جهان کشت می‌شود و تقریباً ۲۰ درصد انرژی و ۲۰ درصد نیازهای پروتئینی جمعیت جهان را تامین می‌کند (Reddy and Hodges, 2000). گندم در بین غلات، بیش‌ترین و وسیع‌ترین سازگاری را به شرایط مختلف اقلیمی دارد. در حال حاضر، این گیاه در سراسر دنیا از کرانه‌های قطبی تا حوالی استوا کشت می‌شود و تقریباً ۱۶ درصد از زمین‌های زراعی دنیا را اشغال کرده است (Hasheminasab et al., 2014). سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد (FAO) با انتشار گزارشی در مورد پیش‌بینی افزایش سطح تولید جهانی غلات اعلام کرد که مجموع ذخایر جهانی این محصول در سال زراعی ۲۰۱۸-۲۰۱۷ به رقم بی‌سابقه ۳ هزار و ۳۳۱ میلیون تن خواهد رسید. تنش‌های محیطی (زیستی و غیرزیستی) تهدیدات جدی برای تولیدات کشاورزی محسوب می‌شوند (Nakabayashi and Saito, 2015). از بین تنش‌های غیرزیستی می‌توان به تنش کمبود عناصر کم‌مصرف (ریزمغذی‌ها) در خاک اشاره کرد. وجود این عناصر در حد کفایت برای کامل کردن چرخه زندگی و رشد گیاهان لازم است. این عناصر در واکنش‌های بسیار ساده تا خیلی پیچیده نقش دارند و نقش یک عنصر ریزمغذی را عنصر دیگر نمی‌تواند برعهده بگیرد (Cole et al., 2010). عنصر روی (Zn)، بر ظرفیت جذب آب و حمل و نقل مواد در گیاهان تاثیر دارد و آثار نامطلوب دوره‌های کوتاه‌مدت تنش گرمایی و نمکی را کاهش می‌دهد (Kasim, 2007). روی در ساختار برخی آنزیم‌ها وجود دارد و باعث فعال شدن آن‌ها می‌شود. کمبود روی، عملکرد دانه و کیفیت آن را کاهش می‌دهد (Haydon and Cobbett, 2007).

یکی از راه‌کارهایی که گیاهان برای مقابله با تنش‌های محیطی استفاده می‌کنند، سیستم آنتی‌اکسیدانت آنزیمی و غیرآنزیمی است. آنتی‌اکسیدانت‌ها مولکول‌هایی هستند که اکسیداسیون مولکول‌های دیگر را که در اثر تنش ایجاد شده است، مهار می‌کنند. اکسیداسیون یک واکنش شیمیایی است که قادر به تولید رادیکال‌های آزاد است که به نوبه خود منجر به واکنش‌های زنجیره‌ای می‌شود. رادیکال‌های فعال اکسیژن به‌طور مستقیم باعث تخریب پروتئین‌ها، اسیدهای آمینه، اسیدهای نوکلئیک و پراکسیداسیون غشایی می‌شوند (Sofa et al., 2004). گیاهان جهت مقابله با تنش

شد. جهت مطالعه بیان ژن، نمونه‌برداری در دو مرحله، یک ماه بعد از جوانه‌زنی (رویشی) و ۳۰ درصد سنبله‌دهی (زایشی)، از برگ و ریشه گیاهان انجام و نمونه‌ها در داخل ازت مایع به فریزر ۸۰- درجه سلسیوس منتقل شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA

استخراج RNA از برگ و ریشه گیاهان با استفاده از بافر RNX-plus™ (سیناکلون، ایران) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. کمیت و کیفیت RNA با استفاده از دستگاه نانودراپ (Thermo، آمریکا) و الکتروفورز ژل آگارز یک درصد تعیین شد. جهت سنتز cDNA از کیت RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific، آمریکا) استفاده شد. قبل از سنتز cDNA، تیمار DNase (بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده کیت سنتز cDNA) به منظور حذف آلودگی DNA ژنومی انجام گرفت. برای اطمینان از فقدان آلودگی DNA ژنومی و اجزای واکنش و صحت سنتز cDNA، واکنش‌های کنترل منفی شامل RT- (عدم استفاده از آنزیم Reverse transcriptase در مرحله سنتز) و NTC (عدم استفاده از RNA در مرحله سنتز) و نیز واکنش کنترل مثبت (سنتز cDNA با استفاده از RNA 3- Glyceroldehyde phosphate dehydrogenase موش موجود در کیت) طبق دستورالعمل شرکت سازنده در نظر گرفته شد.

واکنش‌های Real time PCR

برای مطالعه میزان بیان ژن‌های رمزکننده آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز وابسته به مس و روی و فنیل‌آلانین آمونیاپاز و فاکتور رونویسی *bZIP33*، توالی نواحی رمزکننده این ژن‌ها از بانک‌های اطلاعاتی NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) و Ensemble استخراج و آغازگرهای اختصاصی (جدول ۳) با استفاده از نرم‌افزارهای FastPCR (Kalender *et al.*, 2017) و Gene Runner (www.generunner.net) طراحی شد. واکنش‌های Real time PCR با در نظر گرفتن سه تکرار در حجم ۱۲/۵ میکرولیتر طبق دستورالعمل کیت SYBR Green/ROX qPCR Maser Mix (Thermo Scientific، آمریکا) در دستگاه Rotor-Gene Q مدل ۶۰۰۰ (کیاژن، آمریکا) انجام گرفت. از ژن اکتین به عنوان ژن مرجع در واکنش‌های Real time PCR استفاده شد.

افزایش بیان ژن‌ها تحت شرایط تنش کمبود روی در گندم نان کمبود روی در گیاه گندم نان نشان داد که بیان ژن‌های رمزکننده فاکتور رونویسی *bZIP* تحت شرایط کمبود روی در ریشه و شاخه‌ها تحریک می‌شوند. بیش‌ترین تغییر در بیان ژن‌های *TabZIPF4-7AL*، *TabZIPF3b-7BL* و *TabZIPF4-7DL* در ریشه و شاخه مشاهده شد (Nicholas *et al.*, 2017). این گزارش‌ها نشان می‌دهند که احتمالاً آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و فنیل‌آلانین آمونیاپاز و فاکتور رونویسی *bZIP* در تنش کمبود روی در گیاهان همانند سایر تنش‌های زنده و غیرزنده نقش اساسی دارند (Haydon and Cobbett, 2007). بنابراین، با توجه به اینکه تا کنون بیان ژن‌های رمزکننده این دو آنزیم و فاکتور رونویسی *bZIP33* تحت تنش کمبود روی در گندم نان مطالعه نشده است، این تحقیق اجرا شد که هدف از آن، بررسی الگوی بیان این ژن‌ها در مراحل مختلف رشدی در ریشه و برگ ارقام گندم نان روی-کارا (بیات) و روی-ناکارا (هیرمند) تحت شرایط کمبود روی خاک بود.

مواد و روش‌ها

کشت مواد گیاهی

این تحقیق به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه اجرا شد. بذرهای ارقام بیات (روی-کارا) و هیرمند (روی-ناکارا) (Baghban-Tabiat and Rasouli- Sadaghiani, 2012) در دو سطح روی (صفر و پنج میلی- گرم روی در کیلوگرم خاک) کشت شد. خاک تهیه شده از منطقه شبستر تبریز (دارای کم‌ترین مقدار روی) بعد از غربال با الک دو میلی‌متری، پنج بار با آب معمولی و سپس یک‌بار با آب دوبار تقطیر شسته شد تا میزان روی خاک به کم‌ترین مقدار خود برسد (جدول ۱). قبل از کشت، مواد غذایی مورد نیاز (جدول ۲) با خاک مخلوط شد. علاوه بر مواد غذایی، به خاک نیمی از گلدان‌ها پنج میلی‌گرم در کیلوگرم خاک عنصر روی به صورت $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ افزوده شد. ده عدد بذر از هر رقم ابتدا با الکل ۷۰ درصد ضدعفونی شد و سپس در هر یک از گلدان‌های پلی‌اتیلنی به قطر ۱۱ و ارتفاع ۳۴ سانتی‌متر، چهار کیلوگرم خاک ریخته و بذرهای ضدعفونی شده کاشته شد. طی فصل رشد به منظور جلوگیری از آلودگی روی، از آب دو بار تقطیر برای آبیاری در حد ظرفیت زراعی استفاده شد. همچنین برای جلوگیری از کمبود نیتروژن، چهار میلی‌لیتر محلول نیترات آمونیوم ۹/۳ درصد هر دو هفته یک‌بار به گلدان‌ها اضافه

جدول ۱- مشخصات فیزیکی و شیمیایی خاک شنی مورد استفاده در این آزمایش

Table 1. Physical and chemical characteristics of the sandy soil used in the experiment

Sand (%)	Silt (%)	Clay (%)	Zn (ppm)	Potassium (ppm)	Phosphorus (ppm)	Nitrogen (%)	Organic matter (%)	Lime (%)	Acidity (%)	Salinity (mmoh/cm)
96	1	3	0.15	9.4	2.5	0.61	0.69	9	7.8	1.19

جدول ۲- محلول غذایی مورد استفاده در این آزمایش (Sadeghzadeh et al., 2009)

Table 2. The nutrient solution used in this experiment (Sadeghzadeh et al., 2009)

Ingredients	Amount (ml.kg ⁻¹)	Concentration (g.l ⁻¹)
K2SO4 / KH2PO4	(3)	(48.407) / (30.242)
NH4NO3 / CaCl2.2H2O	(1)	(93) / (147.016)
MgSO4.7H2O	(1)	(20.5)
MnSO4.H2O / Na2MoO4.2H2O / CuSO4.5H2O / H3BO3	(2)	(7.5) / (0.083) / (1.05) / (0.33)
ZnSO4.7H2O	(1.67)	(13.14)

جدول ۳- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در واکنش‌های Real Time PCR

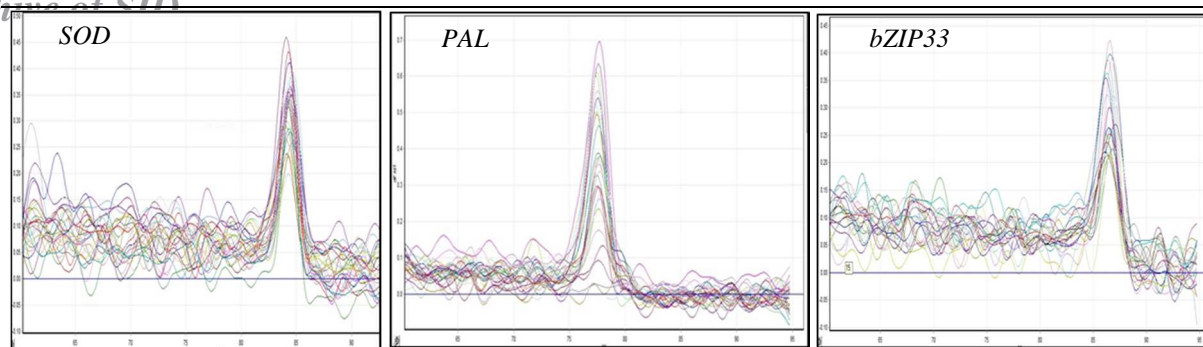
Table 3. Characteristics of the primers used in Real time PCR reactions

Gene [†]	Accession number	Primer sequence (5' - 3')	Annealing temperature (°C)	Amplicon length (bp)
<i>Actin3</i>	TC234027	F: gacgcacaacaggtatcgtgttg R: cagcgaggtcaagacgaaggatg	60	107
<i>SOD</i>	U69536	F: atgggtcatatcaacaggtcca R: tgacggactcatctctgtgtgca	60	109
<i>PAL</i>	AY005474	F: tgctgagcagccgacgagacaa R: taccaggaacctcccgttcacag	63	106
<i>bZIP33</i>	Traes_5AS_6F02C9967	F: agctggttgcagcaatggatgacg R: aggatgccgtcgaagtagctgtcc	63	127

[†]: *SOD*, superoxide dismutase; *PAL*, phenylalanine ammonia-lyase; *bZIP33*, transcription factor.

رنگ با نرم‌افزار Rotor-Gene Q تعیین شد. پس از اتمام واکنش‌ها مقدار حد آستانه به گونه‌ای در نظر گرفته شد که سیگنال‌های فلورسنت را در فاز نمایی قطع کند. بعد از محاسبه حد آستانه با این نرم‌افزار، مقدار بیان نسبی ژن‌های مورد نظر در گیاهان تیمار شده نسبت به کنترل با استفاده از روش $\Delta\Delta CT$ محاسبه شد (Pfaffi, 2001). جهت بررسی نرمال‌بودن داده‌ها و خطاهای آزمایش از روش کولموگروف-اسمیرنوف در نرم‌افزار MINITAB نسخه ۱۹ و برای انجام تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از روش SNK در سطح احتمال یک درصد از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ استفاده شد.

چرخه‌های زمانی برای تکثیر ژن‌های مطالعه شده، با توجه به توالی آغازگرها و اندازه محصول تکثیری شامل فعال‌سازی آغازین آنزیم در دمای ۹۵ درجه به مدت ۱۰ دقیقه در چرخه اول و سپس ۴۰ چرخه شامل مراحل واسرشته‌سازی در دمای ۹۵ درجه به مدت ۱۵ ثانیه، اتصال آغازگرها در دماهای اتصال ویژه هر ژن (جدول ۲) به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله بسط در دمای ۷۲ درجه به مدت ۴۰ ثانیه انجام شد. بعد از اتمام واکنش، منحنی ذوب هر یک از ژن‌ها رسم و صحت تکثیر محصول مربوط به هر ژن با استفاده از منحنی ذوب همان ژن تایید شد (شکل ۱). کمیت نسبی به وسیله اندازه‌گیری افزایش نور فلورسنت در نتیجه اتصال



شکل ۱- منحنی ذوب ژن‌های سوپراکسید دیسموتاز (*SOD*)، فنیل‌آلانین آمونیالیز (*PAL*) و *bZIP33*

Figure 1. Melting curve of superoxide dismutase (*SOD*), phenylalanine ammonia-lyase (*PAL*) and *bZIP33* genes

نتایج و بحث

بر بیان ژن سوپراکسید دیسموتاز معنی‌دار بود. همچنین، برهمکنش سه جانبه بافت × رقم × مرحله نمونه‌برداری بر بیان ژن فنیل‌آلانین آمونیالیز معنی‌دار ($P \leq 0.01$) و برهمکنش دو جانبه بافت × مرحله نمونه‌برداری و بافت × رقم بر بیان ژن *bZIP33* معنی‌دار ($P \leq 0.01$) بود.

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۴) نشان داد که برهمکنش دوجانبه رقم × مرحله نمونه‌برداری و بافت × مرحله نمونه‌برداری در سطح احتمال یک درصد و برهمکنش دوجانبه بافت × رقم در سطح احتمال پنج درصد

جدول ۴- تجزیه واریانس بیان نسبی ژن‌های *SOD*، *PAL* و *bZIP33* در ریشه و برگ ارقام گندم نان در مراحل رویشی و زایشی

Table 4. Analysis of variance for relative expression of *SOD*, *PAL* and *bZIP33* genes in root and leaf of bread wheat cultivars in vegetative and reproductive stages

Source of variations	df	Mean squares		
		<i>SOD</i>	<i>PAL</i>	<i>bZIP33</i>
Cultivar (C)	1	15.67*	751.18**	93.19**
Tissue (T)	1	0.13 ^{ns}	439.04*	18.88*
Sampling stage (S)	1	9.75*	664.71**	21.93**
C × T	1	17.62*	525.51**	65.15**
C × S	1	15.65**	690.39**	0.01 ^{ns}
T × S	1	32.57**	618.83**	19.18**
C × T × S	1	0.69 ^{ns}	537.88**	0.31 ^{ns}
Error	8	0.51	9.73	0.19
CV (%)	-	29.67	40.47	12.12

^{ns}, * and **: Not-significant and significant at 5% and 1% probability levels, respectively.

بیان ژن سوپراکسید دیسموتاز

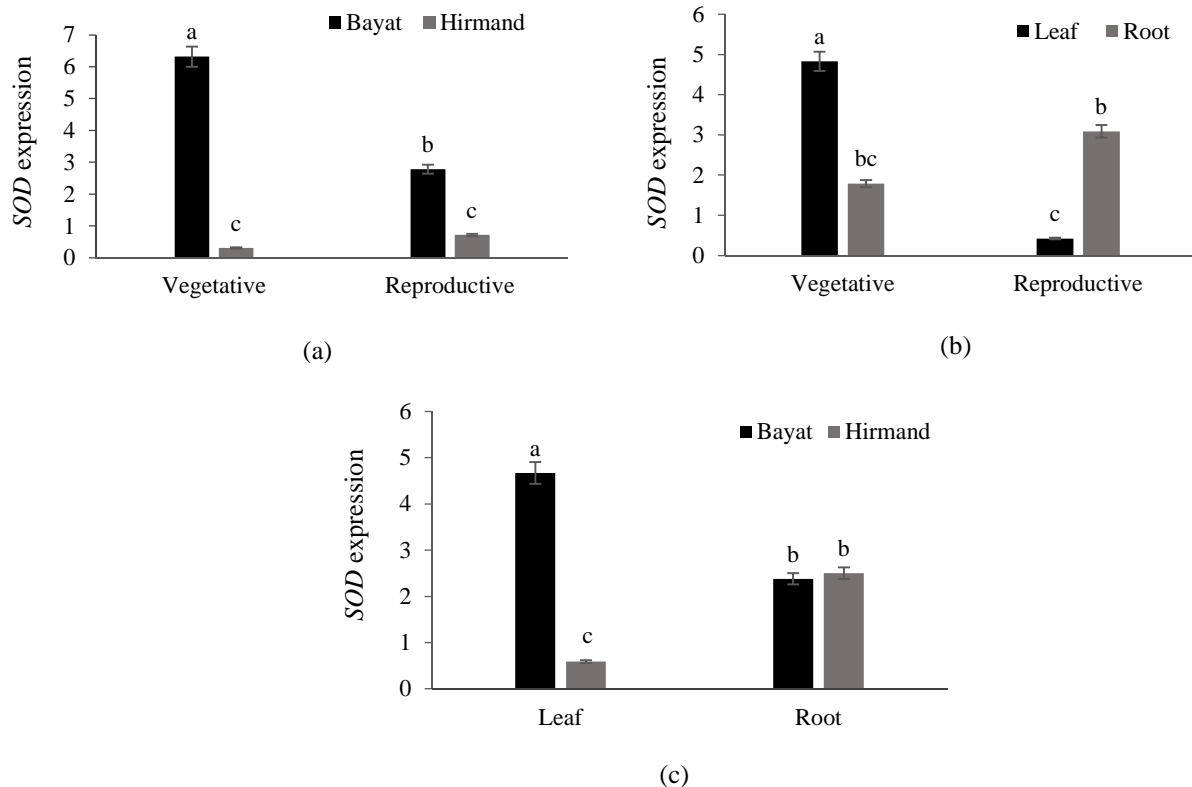
بیان ژن سوپراکسید دیسموتاز نشان داد که بیش‌ترین میزان افزایش بیان این ژن در شرایط کمبود روی خاک در برگ رقم روی-کارا بیات مشاهده شد، اما بیان این ژن در ریشه ارقام روی-کارا و روی-ناکارا تفاوت معنی‌داری نشان نداد (شکل ۲-*C*).

آنزیم سوپراکسید دیسموتاز تبدیل رادیکال سوپراکسید حاصل از تنش به پراکسید هیدروژن (یک مولکول با خاصیت غیررادیکالی) را بر عهده دارد. پراکسید هیدروژن تولید شده توسط آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و یا آسکوربات پراکسیداز تبدیل به آب و اکسیژن می‌شود. افزایش بیان ژن کد کننده آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در

مقایسه میانگین برهمکنش رقم × مرحله نمونه‌برداری بر بیان ژن سوپراکسید دیسموتاز نشان داد که در شرایط کمبود روی افزایش میزان بیان این ژن در مرحله رویشی و زایشی به‌طور معنی‌داری در رقم روی-کارا (بیات) بیش‌تر از رقم روی-ناکارا (هیرمند) بود. (شکل ۲-*a*). همچنین مقایسه میانگین برهمکنش بافت × مرحله نمونه‌برداری بر بیان این ژن نشان داد که میزان افزایش بیان این ژن در شرایط کمبود روی در مرحله رویشی در برگ بیش‌تر از ریشه، ولی در مرحله زایشی در ریشه بیش‌تر از برگ بود (شکل ۲-*b*). مقایسه میانگین برهمکنش بافت × رقم بر

کاهش می‌یابد (Pandey *et al.*, 2012). در گندم افزایش سطح روی باعث بهبود فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و اسید فسفاتاز شد، به طوری که کاربرد روی موجب افزایش ۹۶/۸ درصدی فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و ۷۵/۷۶ درصدی فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز شد (Bharti *et al.*, 2014).

شرایط کمبود روی در رقم روی-کارا در مطالعه حاضر احتمالاً به خاطر نقش آن در کاهش آثار مضر افزایش رادیکال سوپراکسید ناشی از تنش کمبود روی می‌باشد (Comba *et al.*, 2010). در گیاه برنج گزارش شد که میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز تحت تنش کمبود روی در ارقام روی-کارا افزایش و در ارقام روی-ناکارا



شکل ۲- مقایسه میانگین برهمکنش رقم × مرحله نمونه‌برداری (a)، بافت × مرحله نمونه‌برداری (b) و رقم × بافت (c) بر بیان ژن سوپراکسید دیسموتاز (*SOD*) تحت شرایط کمبود روی در ارقام گندم نان. ستون‌های دارای حروف مشترک، اختلاف معنی‌داری بر اساس آزمون SNK در سطح احتمال یک درصد ندارند.

Figure 2. Mean comparisons of cultivar × sampling stage (a), tissue × sampling stage (b) and cultivar × tissue (c) on the relative expression of *SOD* gene under Zn deficiency conditions in bread wheat cultivars. Columns with the similar letters on each graph show no significant difference by SNK test at 1% probability level.

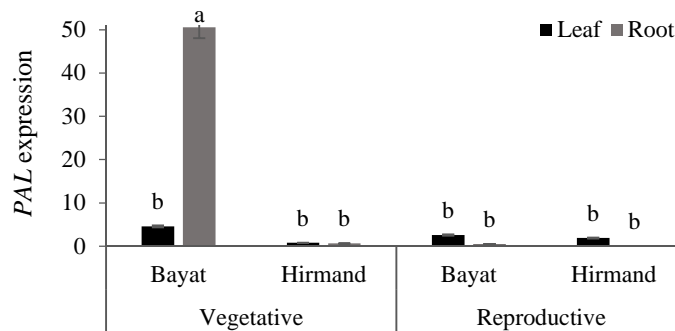
در سنتز ترکیبات فنلی (یکی از مکانیزم‌های دفاعی غیرآنزیمی در گیاهان) دارد و به‌عنوان یکی از شاخص‌های حساس به تغییرات محیطی و نیز یکی از نشانگرهای بیوشیمیایی دفاعی گیاه در برابر تنش‌های محیطی مطرح است (Boudet, 2007; Vogt, 2010). فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیلایز در گیاهان تحت کنترل عوامل داخلی و خارجی مانند هورمون‌ها، نور، آلودگی‌های قارچی و زخم‌ها و میزان مواد غذایی قرار دارد. در واقع ترکیبات فنلی در

بیان ژن فنیل‌آلانین آمونیلایز

نتایج مقایسه میانگین برهمکنش بافت × رقم × مرحله نمونه‌برداری بر بیان ژن فنیل‌آلانین آمونیلایز نشان داد که در شرایط کمبود روی بیش‌ترین میزان افزایش بیان این ژن (بیش از ۵۰ برابر شاهد) در مرحله رویشی در ریشه رقم روی-کارا (بیات) صورت گرفت، اما در مرحله زایشی بیان این ژن در ریشه و برگ ارقام روی-کارا و روی-ناکارا تفاوت معنی‌داری نداشت. آنزیم فنیل‌آلانین آمونیلایز نقش کلیدی

فنیل آلانین آمونیلایز تحت شرایط کمبود روی در رقم روی-کارا در مطالعه حاضر احتمالاً به دلیل نقش این ژن در تولید ترکیبات فنلی و متابولیت‌های ثانویه تحت شرایط تنش و جلوگیری از بروز تنش اکسیداتیو و یا تخفیف آثار آن در سلول‌های گیاهی است.

افزایش بیان ژن‌ها تحت شرایط تنش کمبود روی در گندم نان گیاه در مواجهه با تنش‌های زنده و غیرزنده تجمع می‌یابد که ناشی از القای بسیار سریع بیان ژن کدکننده این آنزیم می‌باشد (Wen et al., 2005). این آنزیم در سنتز ترکیبات فنل پروپانوئیدی و فنلی و متابولیت‌های ثانویه (ترکیبات دفاعی) دخالت دارد (Boudet, 2007). افزایش بیان ژن

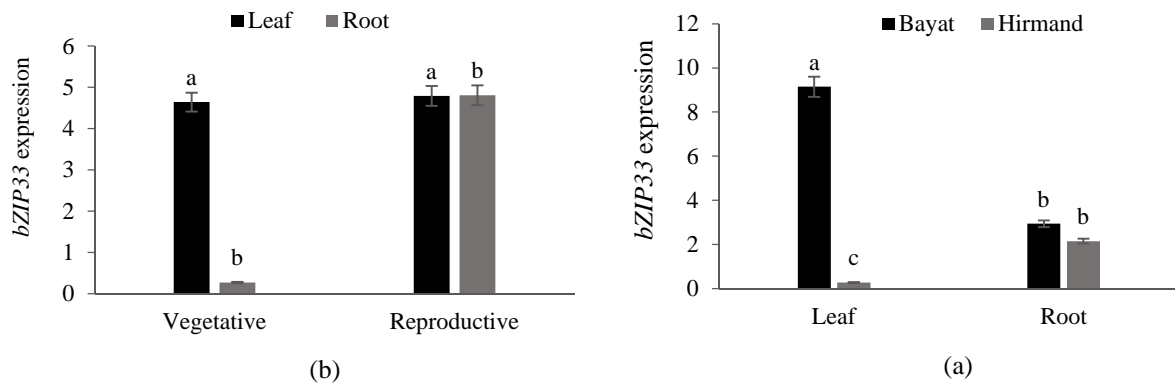


شکل ۳- مقایسه میانگین برهمکنش بافت × رقم × مرحله نمونه‌برداری بر بیان ژن فنیل آلانین آمونیلایز (PAL) در شرایط کمبود روی در ارقام گندم نان. ستون‌های دارای حروف مشترک، اختلاف معنی‌داری بر اساس آزمون SNK در سطح احتمال یک درصد ندارند.
 Figure 3. Mean comparison of tissue × cultivar × sampling stage on the relative expression of PAL gene in bread wheat cultivars. Columns with the similar letters show no significant difference by SNK test at 1% probability level.

شرایط تنش نقش دارند (Durmaz et al., 2011). افزایش بیان ژن *bZIP33* احتمالاً به دلیل نقش آن در القای بیان ژن‌های ZIP تحت شرایط تنش روی است. در *Arabidopsis* بیان دو ژن *AtbZIP19* و *AtbZIP23* (از گروه F فاکتور رونویسی *bZIP*) در شرایط کمبود روی دو برابر شد، در حالی که بیان ژن *AtbZIP24*، یکی دیگر از اعضای گروه F، تحت همین شرایط تغییری نکرد. همچنین، در همین تحقیق گزارش شد که دو فاکتور رونویسی *bZIP19* و *bZIP23* در آرابیدوپسیس در پاسخ به کمبود روی نقش اساسی دارند (Assunção et al., 2010). در جو نیز گزارش شد که بیان ژن‌های رمزکننده فاکتورهای رونویسی *HvbZIP1*، *HvbZIP10* و *HvbZIP58* در شرایط کمبود روی به‌طور قابل توجهی در ریشه‌ها و شاخه‌ها افزایش یافت (Nazri et al., 2017). در تحقیق حاضر نیز افزایش بیان ژن *bZIP33* در شرایط کمبود روی احتمالاً به دلیل نقش این ژن در القای بیان ژن‌های ZIP می‌باشد. افزایش بیان این ژن در هر دو اندام ریشه و برگ نیز احتمالاً بیانگر دخالت این فاکتور رونویسی در فعال‌سازی ژن‌های ZIP است، هر چند بیان بالای این ژن در برگ نشانگر نقش اساسی این فاکتور رونویسی در فعال‌سازی ZIP‌های دخیل در انتقال روی در داخل گیاه است.

بیان ژن *bZIP33*

مقایسه میانگین برهمکنش بافت × رقم بر بیان ژن *bZIP33* نشان داد که بیش‌ترین میزان افزایش بیان این ژن تحت شرایط کمبود روی در برگ رقم روی-کارا (بیات) بود و افزایش بیان این ژن در برگ این رقم به‌طور قابل توجهی بیش‌تر از رقم روی-ناکارا بود، ولی بیان این ژن در ریشه این دو رقم تفاوت معنی‌داری نشان نداد (شکل ۴-a). مقایسه میانگین برهمکنش بافت × مرحله نمونه‌برداری نشان داد که تحت شرایط کمبود روی، افزایش بیان این ژن در برگ در مرحله رویشی به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از ریشه بود، ولی در مرحله زایشی هر چند بیان این ژن در هر دو بافت برگ و ریشه بیش از ۴/۷ برابر گیاهان شاهد افزایش یافت، ولی اختلاف معنی‌داری بین دو بافت مشاهده نشد (شکل ۴-b). خانواده *bZIP* یکی از مهم‌ترین عوامل رونویسی است که در بیش‌تر تنش‌ها دخالت دارد و باعث کنترل بیان تعداد زیادی ژن به‌ویژه ژن‌های ZIP (ترنسپورتهای دخیل در جذب روی از خاک و انتقال آن در داخل گیاه) طی تنش می‌شوند (Hwang et al., 2014). ناقل‌های خانواده ZIP در جذب روی از خاک و انتقال آن از بیرون سلول به داخل سیتوپلاسم به‌ویژه در



شکل ۴- مقایسه میانگین برهمکنش بافت × رقم (a) و بافت × مرحله نمونه‌برداری (b) بر بیان ژن *bZIP33* تحت شرایط کمبود روی در ارقام گندم نان. ستون‌های دارای حروف مشترک، اختلاف معنی‌داری بر اساس آزمون SNK در سطح احتمال یک درصد ندارند.
 Figure 4. Mean comparisons of tissue × cultivar (a) and tissue × sampling stage (b) on the relative expression of *bZIP33* gene in bread wheat cultivars. Columns with the similar letters on each graph show no significant difference by SNK test at 1% probability level.

اندام برگ و ریشه اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. بیان ژن رمزکننده فاکتور رونویسی *bZIP33* تحت شرایط کمبود روی در برگ رقم روی-کارا به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از رقم روی-ناکارا بود، ولی اختلاف بیان این ژن در ریشه بین دو رقم روی-کارا و روی-ناکارا معنی‌دار نبود. بنابراین، ژن‌های رمزکننده آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و فنیل‌آلانین آمونیلایز و فاکتور رونویسی *bZIP33* در تحمل ارقام گندم نان روی-کارا به تنش کمبود روی خاک دخیل هستند.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تحت شرایط کمبود روی میزان بیان ژن سوپراکسید دیسموتاز در هر دو مرحله رویشی و زایشی به‌طور معنی‌داری در رقم بیات (روی-کارا) بیش‌تر از رقم هیرمند (روی-ناکارا) بود. بیش‌ترین میزان افزایش بیان ژن فنیل‌آلانین آمونیلایز (۵۰/۵۶ برابر شاهد) در ریشه رقم روی-کارا در مرحله رویشی مشاهده شد، اما در مرحله زایشی بین ارقام روی-کارا و روی-ناکارا در هر دو

References

- Alscher, R. G., Erturk, N. and Heath, L. S. 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* 53 (372): 1331-1341.
- Alves, M. S., Dadalto, S. P., Gonçalves, A. B. and De Souza, G. B. 2013. Plant bZIP transcription factors responsive to pathogens. *International Journal of Molecular Sciences* 14: 7815-7828.
- Asada, K. 1992. Ascorbate peroxidase- a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum* 85: 235-241.
- Assunção, A. G., Herrero, E., Lin, Y. F., Huettel, B., Talukdar, S., Smaczniak, C. and Aarts, M. G. 2010. *Arabidopsis thaliana* transcription factors *bZIP19* and *bZIP23* regulate the adaptation to zinc deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 10296-10301.
- Baghban-Tabiat, S. and Rasouli-Sadaghiani, M. 2012. Investigation of Zn utilization and acquisition efficiency in different wheat genotypes at greenhouse conditions. *Journal of Science and Technology of Greenhouse Culture* 3: 17-32. (In Persian with English Abstract).
- Bharti, K., Pandey, N., Shankhdhar, D., Srivastava, P. C. and Shankhdhar, S. C. 2014. Effect of different zinc levels on activity of superoxide dismutases & acid phosphatases and organic acid exudation on wheat genotypes. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 20 (1): 41-48.
- Boudet, A. M. 2007. Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry* 68: 2722-2735.
- Cole, C. R., Grant, F. K., Swaby-Ellis, E. D., Smith, J. L., Jacques, A., Northrop-Clewes, C. A. and Ziegler, T. R. 2010. Zinc and iron deficiency and their interrelations in low-income African American and Hispanic children in Atlanta. *Journal of Clinical Nutrition* 91 (4): 1027-1034.
- Comba, M. E., Benavides, M. P. and Tomaro, M. L. 2010. Effect of salt stress on antioxidant defense system in soybean root nodules. *Australian Journal of Plant Physiology* 25: 665-671.

- Durmaz, E., Coruh, C., Dinler, G., Grusak, M. A., Peleg, Z., Saranga, Y., Fahima, T., Yazici, A., Ozturk, L., Cakmak, I. and Budak, H. 2011.** Expression and cellular localization of ZIP1 transporter under zinc deficiency in wild emmer wheat. **Plant Molecular Biology Reporter** 29: 582-596.
- Gupta, B., Pathak, G. C. and Pandey, N. 2011.** Induction of oxidative stress and antioxidant responses in *Vigna mungo* by zinc stress. **Journal of Plant Physiology** 58: 85-91.
- Hasheminasab, F. S., Mousavi Baygi, M., Bakhtiari, B. and Bannayan Aval, M. 2014.** The effects of rainfall on dryland wheat yield and water requirement satisfaction index at different time scales. **Journal of Irrigation and Water Engineering** 5: 1-13. (In Persian with English Abstract).
- Haydon, M. J. and Cobbett, C. S. 2007.** Transporters of ligands for essential metal ions in plants. **New Phytologist** 174: 499-506.
- Hwang, I., Jung, H. J., Park, J. I., Yang, T. J. and Nou, I. S. 2014.** Transcriptome analysis of newly classified bZIP transcription factors of *Brassica rapa* in cold stress response. **Genomics** 104: 194-202.
- Jakoby, M., Weisshaar, B., Droge-Laser, W., Vicente-Carbajosa, J., Tiedemann, J., Kroj, T. and Parcy, F. 2002.** bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. **Trends in Plant Science** 7: 106-111.
- Kalendar, R., Khassenov, B., Ramankulov, Y., Samuilova, O. and Ivanov, K. I. 2017.** Fast PCR: An *in silico* tool for fast primer and probe design and advanced sequence analysis. **Genomics** 109: 312-319.
- Kasim, W. A. 2007.** Physiological consequences of structural and ultra-structural changes induced by Zn stress in *Phaseolus vulgaris*. I. Growth and photosynthetic apparatus. **International Journal of Botany** 3: 15-22.
- Kukavica, B. and Jovanovic, S. V. 2004.** Senescence-related changes in the antioxidant status of ginkgo and birch leaves during autumn yellowing. **Physiologia Plantarum** 122 (3): 321-327.
- Myung-Min, H., Trick, H. N. and Rajasheka, E. B. 2009.** Secondary metabolism and antioxidant are involved in environmental adaptation and stress tolerance in lettuce. **Journal of Plant Physiology** 166: 180-191.
- Nakabayashi, R. and Saito, K. 2015.** Integrated metabolomics for abiotic stress responses in plants. **Current Opinion in Plant Biology** 24: 10-16.
- Nazri, A. Z., Griffin, J. H. C., Peaston, K. A., Alexander-Webber, D. G. A. and Williams, L. E. 2017.** F-group bZIPs in barley-a role in Zn deficiency. **Plant Cell and Environment** 40: 2754-2770.
- Nicholas, P., Peter, B., Lorraine, E. and Malcolm, J. 2017.** The role of ZIP transporters and group F bZIP transcription factors in the Zn-deficiency response of wheat (*Triticum aestivum*). **The Plant Journal** 92: 291-304.
- Noctor, G. and Fover, C. H. 1998.** Ascorbat and Glutathione: Keeping active oxygen under control. **Physiology and Molecular Biology of Plants** 42: 249-279.
- Pandey, N., Gupta, B. and Pathak, G. C. 2012.** Antioxidant responses of pea genotypes to zinc deficiency. **Russian Journal of Plant Physiology** 59: 198-205.
- Pfaffi, M. W. 2001.** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research** 29: e45.
- Reddy, K. H. and Hodges, H. F. 2000.** Climate change and global crop productivity. CABI Publishing, Wallingford.
- Sadeghzadeh, B., Rengel, Z. and Li, C. 2009.** Differential zinc efficiency of barley genotypes grown in soil and chelator-buffered nutrient solution. **Journal of Plant Nutrition** 32: 1744-1767.
- Sofa, A., Dichio, B., Xiloyannis, C. and Masia, A. 2004.** Lipoxygenase activity and proline accumulation in leaves and roots of olive trees in response to drought stress. **Physiologia Plantarum** 121: 58-65.
- Wen, P. F., Chen, J. Y., Kong, W. F., Pan, Q. H., Wan, S. B. and Huang, W. D. 2005.** Salicylic acid induced the expression of phenylalanine ammonia-lyase gene in grape berry. **Plant Science** 169: 928-934.
- Vogt, T. 2010.** Phenylpropanoid biosynthesis. **Molecular Plant** 3: 2-20.
- Yue, L., Shi, X., Zhong-lin, C. H. and Su-nan, X. 2013.** Impacts of zinc, benzo[a]pyrene, and their combination on the growth and antioxidant enzymes activities of wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. **Chinese Journal of Ecology** 32: 358-362.



University of Guilan
Faculty of Agricultural
Sciences

Cereal Research
Vol. 9, No. 1, Spring 2019 (17-26)

Enhanced expression of superoxide dismutase, phenylalanine ammonia-lyase and *bZIP33* transcription factor encoding genes under Zn deficiency conditions in bread wheat (*Triticum aestivum* L.)

Fatemeh Mahmoudi Malhamlu¹ and Babak Abdollahi Mandoulakani^{2*}

Received: December 22, 2018

Accepted: March 13, 2019

Abstract

A factorial experiment (based on completely randomized design) with three replications was conducted in greenhouse to investigate the effect of soil Zn deficiency on the expression levels of genes encoding superoxide dismutase (SOD) and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) antioxidant enzymes and *bZIP33* transcription factor in Zn-efficient and -inefficient bread wheat cultivars. Bayat (Zn-efficient) and Hirmand (Zn-inefficient) cultivars were grown under soil Zn deficiency and normal conditions. The expression levels of three above-mentioned genes were measured using Real time PCR technique in leaf and root of the cultivars at two growth stages, one month after germination (vegetative) and 30% of heading (reproductive). The results of analysis of variance and mean comparisons of the treatments showed that the increased expression of *SOD* gene in vegetative and reproductive stages in Zn-efficient (Bayat) cultivar is more than that of Zn-inefficient (Hirmand) cultivar. The highest expression of *PAL* (50.56 fold) was observed in root of Zn-efficient (Bayat) cultivar at vegetative stage, but no significant difference was observed for *PAL* gene expression between Zn-efficient and -inefficient cultivars in both leaf and root tissues. The expression level of *bZIP33* in the leaf of Zn-efficient cultivar (Bayat) under Zn deficiency conditions was more than that of Zn-inefficient cultivar, while no significant difference was found for the expression of this gene between Zn-efficient and -inefficient cultivars in root. Therefore, the results of this study demonstrated that *SOD*, *PAL* and *bZIP33* genes (probably through activation of Zn transporter genes) are involved in tolerance to soil Zn deficiency stress in Zn-efficient bread wheat cultivar.

Keywords: Antioxidant enzymes, *bZIP* group transcription factor, Real time PCR

1. M. Sc. Student, Dept. of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

2. Assoc. Prof., Dept. of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

* Corresponding author: b.abdollahi@urmia.ac.ir