

تحقیقات غلات

دوره نهم / شماره چهارم / زمستان ۱۳۹۸ (۳۴۷-۳۵۷)

الگوی بیان ژن‌های *HMA1*، *HMA2* و *HMA9* تحت شرایط کمبود روی در ارقام گندم نان با کارایی متفاوت جذب عنصر روی

کامران مرادی^۱ و بابک عبدالهی مندولکانی^{۲*}

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۱۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۷/۱۷

چکیده

پروتئین‌های مرتبط با عناصر سنگین (HMA: Heavy Metal Associated Proteins) در جذب روی (Zn) از خاک و جابه‌جایی آن در گیاهان نقش دارند. به‌منظور مطالعه بیان ژن‌های *HMA1*، *HMA2* و *HMA9* در ارقام گندم نان روی-کارا و روی-ناکارا تحت شرایط کمبود روی، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه اجرا شد. دو رقم روی-کارا (هامون) و روی-ناکارا (هیرمند) تحت شرایط کمبود روی (صفر) و کفایت آن (۵ میلی‌گرم روی در کیلوگرم خاک) کشت و بیان نسبی این ژن‌ها در ریشه و برگ در دو مرحله رشدی یک ماه بعد از کشت (مرحله رویشی) و ۳۰ درصد گلدهی (مرحله زایشی) با Real time PCR اندازه‌گیری شد. نتایج این آزمایش نشان داد که بیش‌ترین میزان افزایش بیان ژن‌های *HMA1* (۳۰/۵۹ برابر شاهد) و *HMA2* (۱۳/۶۵ برابر شاهد) در مرحله زایشی به‌ترتیب در برگ و ریشه رقم هامون مشاهده شد. در مقابل، بیش‌ترین میزان افزایش بیان ژن *HMA9* (۴۸/۸۳ برابر شاهد) در ریشه رقم هامون در مرحله رویشی مشاهده شد و در مرحله زایشی اختلاف معنی‌داری بین ارقام روی-کارا و روی-ناکارا به‌لحاظ میزان بیان این ژن در ریشه مشاهده نشد. بنابراین، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که بیان ژن‌های *HMA1*، *HMA2* و *HMA9* در تحمل به تنش کمبود روی خاک در ارقام گندم نان روی-کارا دخیل هستند.

واژه‌های کلیدی: ارقام روی‌کارا، پروتئین‌های مرتبط با عناصر سنگین، واکنش زنجیره‌های پلیمرز در زمان واقعی

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲- دانشیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

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

مقدمه

عوامل محرک بیرونی شامل مجموعه پیچیده‌ای از تنش‌های زیستی و غیرزیستی هستند که گیاه با استفاده از ساز و کارهای جبرانی خود، قادر به محدود یا تخفیف آثار آنها می‌باشد. تنش‌های غیرزیستی مهم‌ترین عوامل محیطی هستند که با تحت تاثیر قرار دادن فرآیندهای مرفولوژیک، فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و مولکولی نقش قابل‌توجهی در تعیین پتانسیل عملکرد و تولید گیاهان دارند (Tuteja and Gill, 2012). تنش‌های غیرزیستی در سراسر دنیا به عنوان بزرگ‌ترین محدودیت برای تولید محصول به شمار می‌روند، به طوری که بیش از ۵۰ درصد کاهش عملکرد، نتیجه مستقیم اثرات تنش‌های غیرزیستی است (Munns and Tester, 2008). از جمله تنش‌های غیرزیستی می‌توان به کمبود عناصر کم‌مصرف در خاک اشاره کرد. عناصر کم‌مصرف از عناصر ضروری مورد نیاز گیاهان هستند که در فرآیندهای مختلفی مشارکت دارند و کمبود آنها تاثیر زیادی در کاهش کمیت و کیفیت محصولات کشاورزی دارد. کمبود روی یکی از شایع‌ترین کمبود عناصر کم‌مصرف در غلات به‌ویژه گندم است و عملکرد گیاه را به‌طور معنی‌داری کاهش می‌دهد (Erenoglu et al., 2002). کمبود روی در گندم باعث کاهش محتویات کربوهیدرات در برگ و ساقه هنگام تشکیل سنبله می‌شود (Malakouti, 2007). به‌طور کلی خاک‌هایی که کم‌تر از ۰/۵ میلی‌گرم در کیلوگرم روی دارند، خاک‌های با کمبود روی محسوب می‌شوند (Lindsay and Norvell, 1978). راهکارهای مختلفی برای مقابله با کمبود روی وجود دارد (Pandey et al., 2012). در سال‌های اخیر استفاده از ژنوتیپ‌های روی-کارا، از جمله راهکارهای امیدبخشی است که به‌طور موثری به افزایش عملکرد گیاه در واحد سطح در شرایط کمبود روی کمک می‌کند (Graham et al., 1992; Rengel, 2001). به‌نظر می‌رسد که گیاهان روی-کارا در شرایط کمبود روی، با افزایش ترشحات ریشه و تشکیل کمپلکس‌های آلی روی و نیز بیان ژن‌های ناقل روی در ریشه، باعث افزایش جذب روی می‌شوند (Neumann and Romheld, 2007). بسیاری از عناصر از جمله روی، توانایی انتشار بین غشای سلول‌ها را ندارند و از این‌رو جهت انتقال این عنصر به سیتوپلاسم سلول به پروتئین‌های ناقل ویژه نیاز دارند (Sekler et al., 2007). به‌همین دلیل، شناسایی، تعیین ویژگی‌ها و مطالعه بیان

ژن‌های کدکننده پروتئین‌های ناقل روی در گیاهان، می‌تواند در ایجاد ارقام متحمل به کمبود روی خاک در گیاه گندم به‌عنوان پرمصرف‌ترین محصول گیاهی جهان یک راهکار اساسی باشد. پروتئین‌های P-type ATPase یک خانواده بزرگ پروتئین‌های ناقل را تشکیل می‌دهند که در انتقال ذرات باردار از غشای سلولی با هیدرولیز ATP درگیر هستند (Bernard et al., 2004). این پروتئین‌های غشایی، که تقریباً در تمام موجودات شناسایی شده‌اند (به‌جز برخی باکتری‌ها و آرکی‌ها)، بر اساس مشابهت توالی و عملکرد، طبقه‌بندی می‌شوند که شامل ATPase-H⁺ ها (A3) (در گیاهان و قارچ‌ها)، ATPase-K⁺/Na⁺ ها (C/D2) (در حیوانات)، ATPase (A/B2) و ATPase های فلزات سنگین (B1) یا (Heavy metal associated protein: HMA) هستند. گروه B1 از ATPase P-type ها که به‌عنوان HMA (Axelsen and Palmgren, 1998)، یا CPx-type (Williams et al., 2000) شناخته می‌شوند، ناقل فلزات سنگین نظیر یون‌های مس، روی، کادمیوم، نقره، سرب و کبالت در سراسر غشای سلولی هستند (Rensing et al., 1999). این ناقل‌ها با استفاده از زمین‌های متصل شونده به فلز، یون‌های Zn را از سلول‌های اطراف بافت‌های آوندی ریشه جذب و با انتقال آن به سلول‌های آوند چوبی، باعث توزیع یون Zn به بخش‌های هوایی می‌شود (Williams and Mills, 2005).

کوبت و همکاران (Cobbett et al., 2003) هشت نوع HMA در *Arabidopsis* شناسایی و با مقایسه توالی آنها گزارش کردند که به‌طور کلی ATPase های نوع B1 به دو گروه تقسیم می‌شوند: گروه اول ناقل‌های کاتیونی تک‌ظرفیتی Ag⁺/Cu⁺ شامل *AtHMA5*، *AtHMA6*، *AtHMA7* و *AtHMA8* و گروه دوم ناقل‌های کاتیونی دو ظرفیتی Co²⁺/Zn²⁺/Pb²⁺/Cd²⁺ شامل *AtHMA1*، *AtHMA2*، *AtHMA3* و *AtHMA4* هستند. اما در تک‌لپه‌هایی مانند برنج با تجزیه و تحلیل ژنوم، نه نوع HMA شناسایی شد که گروه اول ناقل‌های کاتیونی تک‌ظرفیتی Ag⁺/Cu⁺ شامل *OsHMA4*، *OsHMA5*، *OsHMA6*، *OsHMA7*، *OsHMA8* و *OsHMA9* و گروه دوم ناقل‌های کاتیونی دو ظرفیتی Co²⁺/Zn²⁺/Pb²⁺/Cd²⁺ شامل *OsHMA1*، *OsHMA2* و *OsHMA3* بودند (Takahashi et al., 2012a).

روی یکی از شایع‌ترین موارد کمبود عناصر کم‌مصرف در غلات به‌ویژه گندم است و با توجه به اهمیت و نقش این عنصر در فرایندهای بیوشیمیایی سلول و اثر کلیدی ژن‌های کدکننده پروتئین‌های HMA در جذب و انتقال روی در گیاهان، این تحقیق اجرا شد که هدف آن بررسی الگوی بیان ژن‌های *HMA1*، *HMA2* و *HMA9* تحت شرایط کمبود روی خاک در ریشه و برگ ارقام گندم نان روی-کارا و روی-ناکارا در دو مرحله رشدی بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و طرح آزمایش

مواد گیاهی این آزمایش، دو رقم هامون (روی-کارا) و هیرمند (روی-ناکارا) (Baghban-Tabiat and Rasouli-Sadaghiani, 2012) بودند. آزمایش به‌صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه ارومیه در سال‌های ۹۷-۱۳۹۶ اجرا شد. بذر دو رقم گندم تحت شرایط کمبود روی (صفر) و کفایت روی (پنج میلی‌گرم روی در کیلوگرم خاک از منبع سولفات روی به‌عنوان شاهد) کشت و نمونه‌برداری از ریشه و برگ گیاهان در دو مرحله ساقه‌دهی (کد ۲۰ زیدوکس) و ۳۰ درصد گلدهی (کد ۶۳ زیدوکس) (Zadoks et al., 1974) انجام و با استفاده از نیتروژن مایع به فریزر با دمای ۸۰- درجه سلسیوس منتقل شد. خاک مورد استفاده در این آزمایش (جدول ۱) از بستر شنی منطقه شستر تبریز که از لحاظ مقدار روی بسیار فقیر بود، تهیه شد. خاک با الک دو میلی‌متری غربال و سپس پنج بار با آب معمولی شسته و با آب دوبار تقطیر آب‌کشی و هواخشک شد (Baghban-Tabiat and Rasouli-Sadaghiani, 2012). مواد غذایی مورد نیاز (جدول ۲) قبل از کشت به‌صورت محلول تهیه و با خاک همه گلدان‌ها مخلوط شد. محلول نیترات آمونیوم جهت جلوگیری از کمبود نیتروژن، هر دو هفته یکبار به گلدان‌ها افزوده شد. بذر ارقام توسط پراکسید هیدروژن (H_2O_2) یک درصد ضدعفونی و در گلدان‌های پلی‌اتیلنی حاوی پنج کیلوگرم خاک کشت شد. در طول فصل، آبیاری با استفاده از آب دو بار تقطیر در حد ظرفیت زراعی انجام شد.

ویلیامز و همکاران (Williams and Mills, 2005) گزارش کردند که بیان ژن *OsHMA1* تحت شرایط کمبود روی در اندام‌های هوایی در برنج افزایش می‌یابد. همچنین تاکاهاشی و همکاران (Takahashi Takahashi et al., 2012a) نشان دادند که بیان ژن *OsHMA1* در شرایط کمبود روی به‌طور قابل‌توجهی در پهنک برگ برنج افزایش می‌یابد. البته این ژن در گل‌آذین، بساک، مادگی، جنین و تخمدان نیز بیان می‌شود و گزارش شد که این ژن در انتقال روی و تخلیه آن از پلاستیدها نقش دارد. علاوه بر این، تاکاهاشی و همکاران (Takahashi et al., 2012b) گزارش کردند که غلظت روی با خاموشی ژن *OsHMA2* در برگ‌های برنج کاهش، ولی در ریشه افزایش می‌یابد. این نتایج نشان داد که *OsHMA2* نقش مهمی در بارگذاری روی به آوند چوبی و در انتقال این فلز از ریشه به شاخه در شرایط کمبود روی دارد. باراباس و همکاران (Barabasz et al., 2013) با مطالعه تاثیر غلظت‌های مختلف روی و کادمیوم خاک بر بیان ژن *HMA2* در ریشه و برگ توتون طی ۱۰ روز، گزارش کردند که این ژن در غلظت‌های پایین روی در انتقال روی از ریشه به شاخه نقش دارد و سطح بیان آن در برگ و ریشه مشابه است. لی و همکاران (Lee et al., 2007) گزارش کردند که در شرایط کمبود روی در برنج، ژن *OsHMA9* در ریشه نسبت به برگ‌ها بیش‌تر بیان می‌شود. هر چند از لحاظ فیلوژنتیک ژن *OsHMA9* در گروه انتقال دهنده کاتیون‌های تک‌ظرفیتی Ag^+/Cu^+ قرار دارد، اما می‌تواند در انتقال روی، کادمیوم و سرب نیز نقش داشته باشد.

گندم در ایران مهم‌ترین غله به‌شمار می‌رود و منبع اصلی کربوهیدرات است (Mirzamasoumzadeh et al., 2013)، به‌طوری‌که بیش‌تر از ۶۰ درصد از زمین‌های قابل کشت کشور، زیر کشت گندم است. ایران با مصرف سرانه گندم در حدود ۱۹۴ کیلوگرم در سال به‌عنوان هفتمین مصرف‌کننده بزرگ گندم در جهان است (Hasheminezhad et al., 2018). ۴۰ درصد از اراضی تحت کشت گندم در ایران دچار کمبود شدید روی هستند (Baghbani et al., 2015). دلیل عمده کمبود روی به عواملی چون آهکی بودن خاک‌ها، pH بالا، فقر مواد آلی و بی‌کربنات فراوان در آب‌های آبیاری بستگی دارد (Sadeghzadeh, 2013). با توجه به اینکه که کمبود

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

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

EC (mmoh/cm)	pH	CaCo3 (%)	Organic matter (%)	N (%)	P (ppm)	K (ppm)	Zn (ppm)	Clay (%)	Silt (%)	Sand (%)
1.19	7.8	9.0	0.69	0.61	2.5	9.4	0.15	3.0	1.0	96.0

جدول ۲- ترکیب محلول غذایی مورد استفاده در این آزمایش (Niazkhani *et al.*, 2018)Table 2. Combination of the nutrient solution used in this experiment (Niazkhani *et al.*, 2018)

Ingredient	Concentration (g/L)	Amount (ml/kg)
KH2PO4 /K2SO4	(48.407) / (30.242)	(3)
CaCl2.2H2O /NH4NO3	(93) / (147.016)	(1)
MgSO4.7H2O	(20.5)	(1)
MnSO4.H2O / Na2MoO4.2H2O /CuSO4.5H2O / H3BO3	(0.333) / (1.05) / (0.083) / (7.5)	(2)
ZnSO4.7H2O	(13.14)	(1.67)

استخراج RNA و سنتز cDNA

استخراج RNA از برگ و ریشه (۰/۲ میلی‌گرم) گیاهان با استفاده از محلول RNX-plus (سیناکلون، ایران) براساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. به‌منظور تعیین کمیت و کیفیت RNA از نانودراپ و الکتروفورز ژل آگارز یک درصد استفاده شد. جهت سنتز cDNA از کیت cDNA First Strand RevertAid (Thermoscientific, USA) Synthesis استفاده شد. همچنین به‌منظور حذف آلودگی DNA ژنومی، قبل از سنتز cDNA تیمار DNase (بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده کیت سنتز cDNA) انجام گرفت. برای اطمینان از صحت واکنش سنتز cDNA و عدم وجود آلودگی DNA ژنومی و اجزای واکنش، انواع کنترل‌ها در واکنش طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت در نظر گرفته شد. این کنترل‌ها 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 ژن Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase موش موجود در کیت) بود.

طراحی آغازگر و واکنش‌های Real time PCR

برای مطالعه بیان نسبی ژن‌های *HMA1*، *HMA2* و *HMA9*، توالی ژن‌ها از سایت NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) استخراج و آغازگرهای اختصاصی با استفاده از نرم‌افزارهای FastPCR (Kalender *et al.*, 2017) و Gene Runner طراحی

شد (جدول ۳). واکنش‌های Real time PCR در حجم ۱۲/۵ میکرولیتر در سه تکرار طبق دستورالعمل کیت Mix Maser qPCR SYBR Green/ROX Rotor-Gene (Thermoscientific, USA) در دستگاه Q مدل ۶۰۰۰ (کیاژن، آمریکا) انجام گرفت. از ژن اکتین (Actin) به‌عنوان ژن مرجع در واکنش‌های Real time PCR استفاده شد. چرخه‌های دمایی و زمانی تکثیر ژن‌ها، با توجه به توالی آغازگرها و اندازه محصول تکثیری شامل فعال‌سازی آغازین آنزیم در دمای ۹۵ درجه به‌مدت ۱۰ دقیقه (یک چرخه) و سپس ۴۰ چرخه شامل مراحل واسرشته‌سازی در دمای ۹۵ درجه به‌مدت ۱۵ ثانیه و اتصال آغازگرها در دمای ۶۰ درجه به‌مدت ۳۰ ثانیه و مرحله بسط در دمای ۷۲ درجه به‌مدت ۴۰ ثانیه انجام شد (جدول ۳). بعد از اتمام واکنش، منحنی ذوب هر کدام از ژن‌ها رسم و صحت تکثیر محصول مربوط به هر ژن با استفاده از منحنی ذوب همان ژن تایید شد. همچنین بعد از محاسبه چرخه آستانه (Cycle of threshold: Ct) با نرم‌افزار Rotor-Gene Q، مقدار بیان نسبی ژن‌های مورد نظر در گیاهان تیمار شده نسبت به شاهد با استفاده از روش $\Delta\Delta CT$ محاسبه شد (Pfaffi, 2001). به‌منظور بررسی نرمال بودن داده‌ها و خطای آزمایشی از روش کلموگراف-اسمیرنوف در نرم‌افزار MINITAB (نسخه ۱۹) استفاده شد. تجزیه واریانس داده‌ها و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از روش SNK در سطح احتمال یک درصد نیز با استفاده از نرم‌افزار SAS (نسخه ۹/۱) انجام شد.

جدول ۳- توالی‌های آغازگرهای مورد استفاده در واکنش Real Time PCR

Table 3. Sequences of the primers used in Real time PCR reaction

Gene	Accession number	Primer sequence	Annealing temperature (°C)	Amplicon length (bp)
<i>Actin3</i>	TC234027	F: 5'-gacgcacaacaggtatcgtgttg R: 5'-cagcgaggtaagacgaaggatg	60	107
<i>HMA1</i>	AK452343.1	F: 5'-cttacctgtagaggagttgtg R: 5'-cagaaccgatagatgccttagc	60	106
<i>HMA2</i>	HM021132.1	F: 5'-cgtgtggacatcacctgaagg R: 5'-catcccttgctcaccgta	60	94
<i>HMA9</i>	AK458571.1	F: 5'-gcaagcgatcaccacaacag R: 5'-ccgtgttcttatgtggatc	60	116

نتایج و بحث

Cd^{2+} ، Co^{2+} و Ca^{2+} و تجمع آن‌ها در کلروپلاست می‌شود (Ding *et al.*, 2017). همچنین در انتقال عنصر Zn^{2+} به خارج از کلروپلاست نقش دارد. افزایش بیان ژن *HMA1* تحت شرایط کمبود روی در برگ رقم روی کارا در مرحله زایشی در این مطالعه احتمالاً به دلیل نقش آن در انتقال یون روی به خارج از کلروپلاست و هدایت این عنصر به اندام‌های زایشی است. در آرابیدوپسیس، ژن *AtHMA1* ترجیحاً در شاخساره‌ها، برگ و گل بیان شد، اما بیان کمی در ریشه داشت (Kim *et al.*, 2009). در برنج بیان ژن *OsHMA1* با کمبود روی در اندام‌های هوایی به‌ویژه پهنک برگ افزایش یافت (Williams and Mills, 2005). البته این ژن در گل‌آذین، سبک، مادگی، جنین و تخمدان برنج نیز بیان شد (Takahashi *et al.*, 2012a). در *Populus trichocarpa* تحت شرایط کمبود Cd^{2+} بیان *PtHMA1* به تدریج در ریشه‌ها نسبت به شاهد افزایش یافت. سطح بیان این ژن در ساقه یک ساعت بعد از تیمار و در برگ‌ها با گذشت زمان افزایش یافت (Li *et al.*, 2015).

تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۴) نشان داد که برهمکنش سه جانبه رقم × بافت × مرحله نمونه‌برداری بر بیان ژن‌های *HMA1*، *HMA2* و *HMA9* معنی‌دار است.

بیان نسبی ژن *HMA1*

مقایسه میانگین برهمکنش رقم × بافت × مرحله نمونه‌برداری (شکل ۱) نشان داد که بیش‌ترین میزان افزایش بیان این ژن *HMA1* (۳۰/۶۰ برابر شاهد) در شرایط کمبود روی در برگ رقم روی-کارا (هامون) در مرحله زایشی مشاهده شد. همچنین افزایش بیان این ژن در شرایط کمبود روی در برگ رقم روی-کارا در هر دو مرحله رویشی و زایشی به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از رقم روی-ناکارا بود، ولی در ریشه در هر دو مرحله رویشی و زایشی، اختلاف معنی‌داری بین دو رقم مشاهده نشد. افزایش بیان این ژن در ریشه قابل‌توجه نبود و حتی در رقم روی-ناکارا بیان آن در شرایط کمبود روی کاهش یافت. پروتئین *HMA1* در غشای کلروپلاست مکان‌یابی شده است که موجب سم‌زدایی عناصر سنگین مانند Zn^{2+}

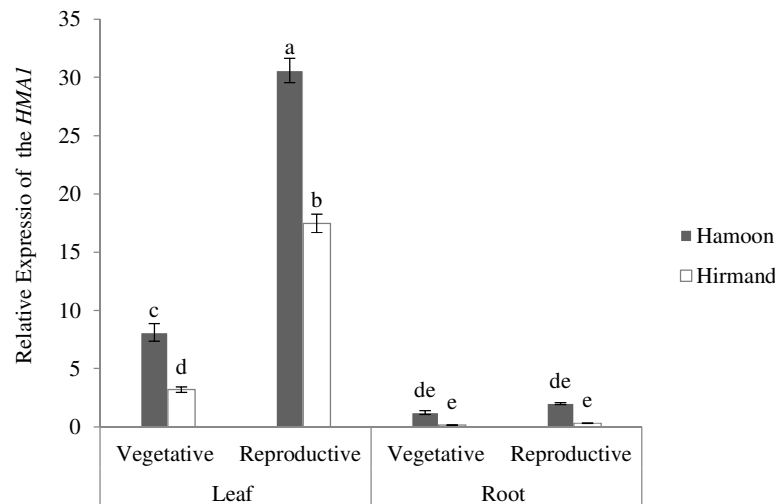
جدول ۴- تجزیه واریانس بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه تحت شرایط کمبود روی در ارقام گندم روی-کارا و روی-ناکارا

Table 4. Analysis of variance for relative expression of *ZIP* genes under soil Zn deficiency conditions in Zn-efficient and Zn-inefficient bread wheat cultivars

Source of variations [†]	df	Mean of squares		
		<i>HMA1</i>	<i>HMA2</i>	<i>HMA9</i>
Cul	1	108.27**	74.52**	616.57**
Tis	1	775.02**	40.40**	554.33**
Sta	1	355.37**	86.98**	1062.61**
Cul×Tis	1	58.19**	55.85**	0.84 ^{ns}
StaxCul	1	19.49**	5.64**	67.33*
StaxTis	1	321.06**	23.49**	1543.33**
Cul×Tis×Sta	1	14.53**	5.04**	246.37**
Error	16	0.30	0.09	9.26
CV (%)	-	6.92	5.22	24.24

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

[†]: Cul, cultivar; Tis, tissue; Sta, sampling stage.



شکل ۱- مقایسه میانگین برهمکنش رقم × بافت × مرحله نمونه‌برداری بر بیان ژن *HMA1* در دو رقم گندم نان روی-کارا (هامون) و روی-ناکارا (هیرمند). ستون‌های دارای حروف مشترک، اختلاف معنی‌داری بر اساس آزمون SNK در سطح احتمال یک درصد ندارند. Figure 1. Mean comparison of cultivar × tissue × sampling stage interaction effect on the relative expression of *HMA1* gene in Zn-efficient (Hamoon) and Zn-inefficient (Hirmand) bread wheat cultivars. Columns followed by the similar letters are not significantly different by SNK test at 1% probability level.

ناقل فلزات سنگین در سیتوپلاسم آشکار می‌سازد و به دلیل اینکه غالباً در غشای پلاسمایی مکان‌یابی شده است، به‌عنوان یک ناقل بین سلولی نیز شناخته می‌شود (Lee *et al.*, 2003; Hussain *et al.*, 2004) و در جذب و انتقال فلزات از ریشه به شاخساره‌ها نقش دارد (Hussain *et al.*, 2004). افزایش بیان *HMA2* در ریشه رقم روی-کارا (هامون) در شرایط کمبود روی در مطالعه حاضر احتمالاً به دلیل نقش این پروتئین در جذب روی از خاک تحت شرایط کمبود روی و انتقال آن به شاخساره طی مرحله زایشی می‌باشد. در برنج، *OshMA2* در سطوح نسبتاً پایینی در برگ‌ها، راس ساقه، و گل‌آذین بیان می‌شود، اما بیش‌ترین بیان آن در بخش‌های پایینی و میانی ریشه مشاهده شده است (Sato-Nagasawa *et al.*, 2011). در بررسی ژن‌های درگیر در انتقال روی و آهن در آراییدوپسیس گزارش شد که فرآیند انتقال روی از ریشه به ساقه بوسیله پروتئین ناقل *HMA2* بستگی به وضعیت روی در خاک دارد و سطح رونویسی این ژن تحت شرایط کمبود روی و مقدار بیش از حد آن متفاوت است (Van de Mortel *et al.*, 2006). همچنین در برنج گزارش شده است که با سرکوب *OshMA2*، غلظت روی در برگ‌ها کاهش یافت، در حالی‌که غلظت روی در ریشه

بیان نسبی ژن *HMA2*

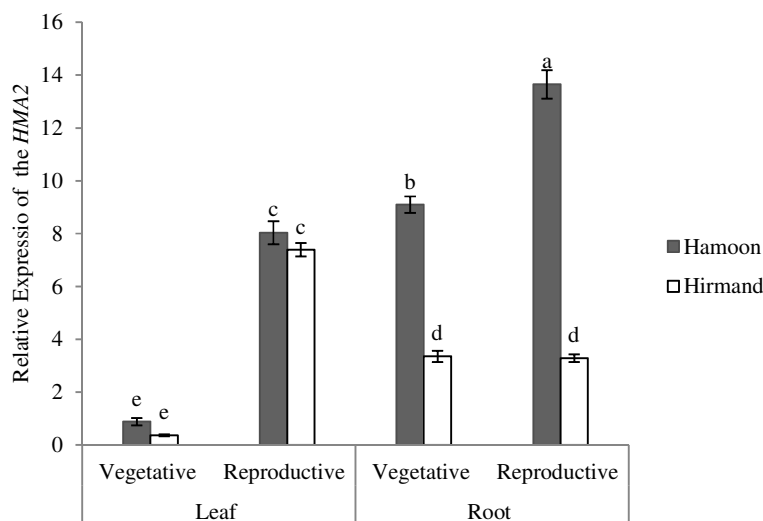
مقایسه میانگین برهمکنش رقم × بافت × مرحله نمونه‌برداری بر بیان ژن *HMA2* (شکل ۲) نشان داد که بیش‌ترین میزان افزایش بیان این ژن (۱۳/۶۵ برابر شاهد) در ریشه رقم روی-کارا (هامون) در مرحله زایشی مشاهده شد، هر چند که در مرحله رویشی نیز بیان این ژن در ریشه رقم هامون نه برابر شاهد افزایش یافت. افزایش بیان این ژن در شرایط کمبود روی در ریشه رقم روی-کارا در هر دو مرحله رویشی و زایشی به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از رقم روی-ناکارا بود، ولی بین برگ دو رقم روی-کارا و روی-ناکارا در هر دو مرحله رویشی و زایشی به‌لحاظ میزان بیان ژن *HMA2* اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد، هر چند که بیان این ژن در مرحله زایشی در برگ هر دو رقم بیش از هفت برابر شاهد افزایش یافت. در رقم روی-کارا (هامون) بیان نسبی ژن *HMA2* در ریشه به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از برگ بود. همچنین بیان این ژن در برگ هر دو رقم در مرحله زایشی به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از مرحله رویشی بود. کاهش غلظت Zn^{2+} و Cd^{2+} گیاهانی که ژن‌های *HMA2* و *HMA4* خاموش شدند، نشان می‌دهد که این پروتئین‌ها نقش مهمی در حفظ تعادل فلز در گیاه دارند. این آثار نقش *HMA2* را به‌عنوان

رقم روی-ناکارا (هیرمند) نیز در مرحله رویشی ۲۴ برابر شاهد افزایش یافت، ولی در برگ رقم روی-ناکارا در هر دو مرحله رویشی و زایشی و نیز در ریشه رقم روی-ناکارا در مرحله زایشی، بیان این ژن نسبت به شاهد کاهش یافت. در برگ رقم روی-کارا در هر دو مرحله رویشی و زایشی بیان این ژن به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از رقم روی-ناکارا افزایش یافت. افزایش بیان *HMA9* در ریشه رقم روی-کارا (هامون) در این تحقیق احتمالاً به‌دلیل نقش این پروتئین در جذب روی از خاک تحت شرایط کمبود روی و انتقال آن به شاخساره طی مرحله رویشی است و همچنین ممکن است در بازسازی روی در برگ‌ها نقش داشته باشد. با توجه به گروه‌بندی ATPase های نوع B1، ژن *HMA9* در گروه اول ناقل‌های کاتیونی تک‌ظرفیتی Ag^+/Cu^+ قرار دارد (Takahashi *et al.*, 2012a). اما تحقیقاتی که در برنج انجام گرفت، نشان داد که *OsHMA9* می‌تواند در انتقال روی، کادمیوم و سرب نیز نقش داشته باشد (Axelsen and Palmgren, 2001).

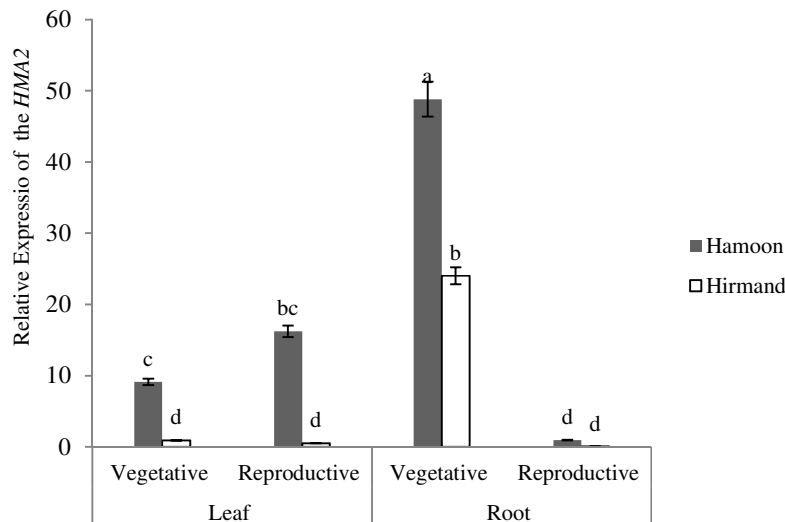
در مقایسه با گیاه نرمال افزایش یافت. این نتایج نشان داد که *OsHMA2* نقش مهمی در بارگذاری روی به زایلیم و در انتقال آن از ریشه به شاخه در شرایط کمبود روی دارد (Takahashi *et al.*, 2012b). با مرور منابع مختلف، می‌توان نتیجه گرفت که افزایش بیان *HMA2* به احتمال زیاد در گیاهانی که تحت شرایط تنش کمبود روی هستند باعث افزایش بارگیری Zn^{2+} به ساقه می‌شود (Sinclair *et al.*, 2018). در آراییدوپسیس، افزایش بیان ژن‌های *AtHMA4* و *AtHMA2* در بساک گزارش شد که نشان‌دهنده نقش مهم این دو ناقل در انتقال روی به بافت‌های زایشی نر است (Hussain *et al.*, 2004).

بیان نسبی ژن *HMA9*

مقایسه میانگین برهمکنش رقم × بافت × مرحله نمونه‌برداری بر بیان ژن *HMA9* (شکل ۳) نشان داد که بیش‌ترین میزان افزایش بیان این ژن (۴۸/۸۳ برابر شاهد) در شرایط کمبود روی در ریشه رقم روی-کارا (هامون) در مرحله رویشی مشاهده شد. البته بیان این ژن در ریشه



شکل ۲- مقایسه میانگین برهمکنش رقم × بافت × مرحله نمونه‌برداری بر بیان ژن *HMA2* در دو رقم گندم نان روی-کارا (هامون) و روی-ناکارا (هیرمند). ستون‌های دارای حروف مشترک، اختلاف معنی‌داری بر اساس آزمون SNK در سطح احتمال یک درصد ندارند. Figure 2. Mean comparison of cultivar × tissue × sampling stage interaction effect on the relative expression of *HMA2* gene in Zn-efficient (Hamoon) and Zn-inefficient (Hirmand) bread wheat cultivars. Columns followed by the similar letters are not significantly different by SNK test at 1% probability level.



شکل ۳- مقایسه میانگین برهمکنش رقم × بافت × مرحله نمونه‌برداری بر بیان ژن *HMA9* در دو رقم گندم نان روی-کارا (هامون) و روی-ناکارا (هیرمند). ستون‌های دارای حروف مشترک، اختلاف معنی‌داری بر اساس آزمون SNK در سطح احتمال یک درصد ندارند.

Figure 3. Mean comparison of cultivar × tissue × sampling stage interaction effect on the relative expression of *HMA9* gene in Zn-efficient (Hamoon) and Zn-inefficient (Hirmand) bread wheat cultivars. Columns followed by the similar letters are not significantly different by SNK test at 1% probability level.

زایشی (۱۳/۶۴ برابر شاهد) و مرحله رویشی (۹/۱ برابر شاهد) در ریشه به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. میزان بیان ژن *HMA9* نیز در شرایط کمبود روی در ریشه در مرحله رویشی به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از مرحله زایشی بود و بیش‌ترین بیان این ژن در این مرحله در ریشه رقم روی-کارا مشاهده شد. بنابراین، به‌نظر می‌رسد که افزایش سطح بیان ناقل‌های روی می‌تواند به‌عنوان راهکاری جهت بهبود روی-کارایی و افزایش عملکرد و کیفیت گندم در خاک‌های با مقدار کم روی قابل دسترس مورد توجه قرار گیرد.

نتیجه‌گیری کلی

به‌طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که ژن‌های *HMA1*، *HMA2* و *HMA9* به‌عنوان ژن‌های کدکننده پروتئین‌های ناقل Zn در گندم نان قادر هستند در صورت بروز تنش کمبود روی، با افزایش بیان و در نتیجه افزایش جذب روی در تنظیم Zn در سلول‌ها مشارکت کنند. بیش‌ترین افزایش بیان ژن *HMA1* در شرایط کمبود روی در مرحله زایشی در برگ رقم روی-کارا مشاهده شد. همچنین در آزمایش حاضر، میزان بیان ژن *HMA2* در شرایط کمبود روی خاک در رقم روی-کارا در مرحله

References

- Axelsen, K. B. and Palmgren, M. G. 1998. Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *Journal of Molecular Evolution* 46 (1): 84-101.
- Axelsen, K. B. and Palmgren, M. G. 2001. Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in Arabidopsis. *Plant Physiology* 126 (2): 696-706.
- Baghbani, A. A., Kadkhodaie, A. and Modarres, S. S. A. M. 2015. Effect of wheat and bean residue along with zinc sulfate on zinc and iron concentration and grain yield of wheat. *Journal of Agricultural Science and Sustainable Production* 25 (3): 91-102. (In Persian with English Abstract).
- 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 (2): 17-32. (In Persian with English Abstract).

- Barabasz, A., Wilkowska, A., Tracz, K., Ruszczynska, A., Bulska, E., Mills, R. F. and Antosiewicz, D. M. 2013. Expression of *HvHMA2* in tobacco modifies Zn-Fe-Cd homeostasis. **Journal of Plant Physiology** 170 (13): 1176-1186.
- Bernard, C., Roosens, N., Czernic, P., Lebrun, M. and Verbruggen, N. 2004. A novel CPx-ATPase from the cadmium hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. **Federation of the European Biochemical Societies Letters** 569 (1-3): 140-148.
- Cobbett, C. S., Hussain, D. and Haydon, M. J. 2003. Structural and functional relationships between type 1_B heavy metal-transporting P-type ATPases in *Arabidopsis*. **New Phytologist** 159 (2): 315-321.
- Ding, J., Ji, C. and Cai, H. 2017. Membrane transporter families of metal microelements make plants grow better and healthier. **Asian Journal of Plant Science and Research** 7 (6): 1-27.
- Erenoglu, B., Nikolic, M., Römheld, V. and Cakmak, I. 2002. Uptake and transport of foliar applied zinc (65 Zn) in bread and durum wheat cultivars differing in zinc efficiency. **Plant and Soil** 241 (2): 251-257.
- Graham, R. D., Ascher, J. S. and Hynes, S. C. 1992. Selecting zinc-efficient cereal genotypes for soils of low zinc status. **Plant and Soil** 146 (1-2): 241-250.
- Hasheminezhad, A., Ghanian, M., Abdeshahi, A. and Khosravipour, B. 2018. Assessment of wheat production related risks in the bread supply chain of Khuzestan province. **Iranian Journal of Agricultural Economics** 49 (3): 439-459. (In Persian with English Abstract).
- Hussain, D., Haydon, M. J., Wang, Y., Wong, E., Sherson, S. M., Young, J., Camakaris, J., Harper, J. F. and Cobbett, C. S. 2004. P-type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in *Arabidopsis*. **The Plant Cell** 16 (5): 1327-1339.
- Kalendar, R., Khassenov, B., Ramankulov, Y., Samuilova, O. and Ivanov, K. I. 2017. FastPCR: An in silico tool for fast primer and probe design and advanced sequence analysis. **Genomics** 109 (3-4): 312-319.
- Kim, Y. Y., Choi, H., Segami, S., Cho, H. T., Martinoia, E., Maeshima, M. and Lee, Y. 2009. *AtHMA1* contributes to the detoxification of excess Zn (II) in *Arabidopsis*. **The Plant Journal** 58 (5): 737-753.
- Lee, J., Bae, H., Jeong, J., Lee, J. Y., Yang, Y. Y., Hwang, I., Martinoia, E. and Lee, Y. 2003. Functional expression of a bacterial heavy metal transporter in *Arabidopsis* enhances resistance to and decreases uptake of heavy metals. **Plant Physiology** 133(2): 589-596.
- Lee, S., Kim, Y. Y., Lee, Y. and An, G. 2007. Rice P_{1B}-type heavy-metal ATPase, *OsHMA9*, is a metal efflux protein. **Plant Physiology** 145 (3): 831-842.
- Li, D., Xu, X., Hu, X., Liu, Q., Wang, Z., Zhang, H. and Li, C. 2015. Genome-wide analysis and heavy metal-induced expression profiling of the *HMA* gene family in *Populus trichocarpa*. **Frontiers in Plant Science** 6: 1149.
- Lindsay, W. L. and Norvell, W. 1978. Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese, and copper 1. **Soil Science Society of America Journal** 42 (3): 421-428.
- Malakouti, M. J. 2007. Zinc is a neglected element in the life cycle of plants. **Middle Eastern and Russian Journal of Plant Science and Biotechnology** 1 (1): 1-12.
- Mirzamasoumzadeh, B., Ghalichechi, S., Salami, M., Karimi, M. and Mohseni, A.B. 2013. The study of wheat genotypes is planted in Ardabil using multivariate statistical methods. **Journal of Farming and Allied Sciences** 2 (8): 188-189.
- Munns, R. and Tester, M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. **Annual Review of Plant Biology** 59: 651-681.
- Neumann, G. and Römheld, V. 2007. The release of root exudates as affected by the plant physiological status. In: Pinton, R., Varanini, Z., Nannipieri, Z. (Eds.). *The rhizosphere: Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*. Boca Raton, FL: CRC Press. pp: 23-72.
- Niazkhani, S. M., Abdollahi Mandoulakani, B., Jafari, M. and Rasouli-Sadaghiani, M. 2018. Studying the expression of *ZIP1*, *ZIP3* and *ZIP6* genes in bread wheat under Zn deficiency conditions. **Cereal Research** 8 (3): 345-358. (In Persian with English Abstract).
- Pandey, N., Gupta, B. and Pathak, G. C. 2012. Antioxidant responses of pea genotypes to zinc deficiency. **Russian Journal of Plant Physiology** 59 (2): 198-205.
- Pfaffi, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real time PCR. **Nucleic Acids Research** 29 (9): e45.

- Rengel, Z. 2001.** Genotypic differences in micronutrient use efficiency in crops. **Communications in Soil Science and Plant Analysis** 32 (7-8): 1163-1186.
- Rensing, C., Ghosh, M. and Rosen, B. P. 1999.** Families of soft-metal-ion-transporting ATPases. **Journal of Bacteriology** 181 (19): 5891-5897.
- Sadeghzadeh, B. 2013.** A review of zinc nutrition and plant breeding. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition** 13 (4): 905-927.
- Satoh-Nagasawa, N., Mori, M., Nakazawa, N., Kawamoto, T., Nagato, Y., Sakurai, K. and Akagi, H. 2011.** Mutations in rice (*Oryza sativa*) heavy metal ATPase 2 (*OsHMA2*) restrict the translocation of zinc and cadmium. **Plant and Cell Physiology** 53 (1): 213-224.
- Sekler, I., Sensi, S. L., Hershinkel, M. and Silverman, W. F. 2007.** Mechanism and regulation of cellular zinc transport. **Molecular Medicine** 13 (7-8): 337-343.
- Sinclair, S. A., Senger, T., Talke, I. N., Cobbett, C. S., Haydon, M. J. and Kraemer, U. 2018.** Systemic upregulation of *MTP2* and *HMA2*-mediated Zn partitioning to the shoot supplements local Zn deficiency responses. **The Plant Cell** 30 (10): 2463-2479.
- Takahashi, R., Bashir, K., Ishimaru, Y., Nishizawa, N. K. and Nakanishi, H. 2012a.** The role of heavy-metal ATPases, HMAs, in zinc and cadmium transport in rice. **Plant Signaling and Behavior** 7 (12): 1605-1607.
- Takahashi, R., Ishimaru, Y., Shimo, H., Ogo, Y., Senoura, T., Nishizawa, N. K. and Nakanishi, H. 2012b.** The *OsHMA2* transporter is involved in root-to-shoot translocation of Zn and Cd in rice. **Plant, Cell and Environment** 35 (11): 1948-1957.
- Tuteja, N. and Gill, S. S. 2012.** Crop improvement under adverse conditions (Eds.). Springer Science and Business Media.
- Van de Mortel, J.E., Villanueva, L. A., Schat, H., Kwekkeboom, J., Coughlan, S., Moerland, P. D., van Themaat, E. V. L., Koornneef, M. and Aarts, M. G. 2006.** Large expression differences in genes for iron and zinc homeostasis, stress response, and lignin biosynthesis distinguish roots of *Arabidopsis thaliana* and the related metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. **Plant Physiology** 142 (3): 1127-1147.
- Williams, L. E. and Mills, R. F. 2005.** P_{1B}-ATPases—an ancient family of transition metal pumps with diverse functions in plants. **Trends in Plant Science** 10 (10): 491-502.
- Williams, L. E., Pittman, J. K. and Hall, J. L. 2000.** Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. **Biochimica et Biophysica Acta** 1465 (1-2): 104-126.
- Zadoks, J. C., Chang, T. T. and Konzak, C. F. 1974.** A decimal code for the growth stages of cereals. **Weed Research** 14: 415-421.



Expression pattern of *HMA1*, *HMA2* and *HMA9* genes under Zn deficiency conditions in bread wheat cultivars with different Zn uptake efficiency

Kamran Moradi¹ and Babak Abdollahi Mandoulakani^{2*}

Received: October 9, 2019

Accepted: February 1, 2020

Abstract

Heavy metal associated (HMA) proteins are involved in zinc (Zn) uptake from soil and its transport in plants. To study the expression pattern of *HMA1*, *HMA2* and *HMA9* genes in Zn-efficient and Zn-inefficient bread wheat cultivars under zinc deficiency conditions, a factorial experiment in completely randomized design (CRD) with three replications was carried out in greenhouse. Two Zn-efficient (Hamoon) and -inefficient (Hirmand) cultivars were grown under Zn deficient and sufficient (5 mg Zn per kg soil) conditions and relative expression of the studied genes in root and leaf at two growth stages, one month after cultivation (vegetative stage) and 30 % flowering (reproductive stage) were measured by real time PCR technique. The results revealed that the highest increase in the expression of *HMA1* (30.9 fold more than check) and *HMA2* (13.65 fold more than check) genes were observed at reproductive stage in the leaf and root of Hamoon cultivar under Zn deficiency conditions, respectively. In contrast, the highest increase in the expression of *HMA9* gene (48.83 fold more than check) was found in the root of Hamoon cultivar at vegetative stage. Also, there was not a significant difference between Zn-efficient and -inefficient cultivars in term of expression of this gene in the root at reproductive stage. In conclusion, the results of the current study showed that the expression of *HMA1*, *HMA2* and *HMA9* genes are involved in soil Zn deficiency tolerance in Zn-efficient bread wheat cultivars.

Keywords: Heavy metal-associated proteins, Real time PCR, Reproductive growth stage, Vegetative growth stage

1. M. Sc. Student, Dept. of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran

2. Assoc. Prof., Dept. of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran

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