doi: 10.22124/CR.2022.20971.1697

(مقاله پژوهشی)

تحقیقات غلات

دوره یازدهم/ شماره سوم/ پاییز ۱۴۰۰ (۲۰۴-۱۹۳)

الگوی بیان ژن‌های کدکننده آنزیم‌های کربنیک آنهیدراز، پراکسیداز و گلوتاتیون اس-ترانسفراز در گندم نان تحت شرایط کمبود روی (Zn)

سحر صالحی[۱]، بابک عبدالهی مندولکانی[۲*]، هادی علی‌پور[۳] و کامران مرادی گنگچین[۴]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۱۲

چکیده

از استراتژی‌های گیاهان در مقابله با تنش‌ها، به‌ویژه تنش‌های مربوط به کمبود ریزمغذی‌ها، استفاده از سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی است. به‌منظور بررسی اثر تنش کمبود روی بر بیان ژن‌های کدکننده آنزیم‌های کربنیک آنهیدراز (*CAN*)، پراکسیداز (*PRX*) و گلوتاتیون اس-ترانسفراز (*GST*) در ارقام روی-کارا (هامون) و روی-ناکارا (هیرمند) گندم نان، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه اجرا شد. ارقام در 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 شامل یک ماه بعد از جوانه‌زنی (رویشی) و ۳۰ درصد سنبله‌دهی (زایشی) با روش Real time PCR اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که بیش‌ترین میزان افزایش بیان ژن کربنیک آنهیدراز (۲۱۱ برابر شاهد) در مرحله زایشی در ریشه رقم روی-کارای هامون مشاهده شد. این ژن در برگ نیز در مرحله زایشی بیان نسبی بالایی در هر دو رقم نشان داد. بیش‌ترین میزان افزایش بیان ژن‌های پراکسیداز (۱۸۷ برابر شاهد) و گلوتاتیون اس-ترنسفراز (۲۳۰ برابر شاهد) در برگ رقم روی-ناکارا (هیرمند) در مرحله زایشی مشاهده شد. به‌طور کلی بیان هر سه ژن در ریشه رقم روی-کارا (هامون) در مرحله زایشی بیش‌تر از رقم روی-ناکارا (هیرمند) بود. البته بیان ژن کربنیک آنهیدراز در برگ رقم روی-کارا نیز به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از رقم روی-ناکارا بود. نتایج این آزمایش نشان داد که در مرحله زایشی، ژنوتیپ‌های روی-کارای گندم نان با افزایش بیش‌تر بیان این ژن‌ها در ریشه، به‌طور مؤثرتری می‌توانند نسبت به ژنوتیپ‌های روی-ناکارا در برابر آسیب‌های حاصل از تنش تحت شرایط کمبود روی مقابله کنند.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، ارقام روی-کارا، ارقام روی-ناکارا، Real time PCR

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

۲- استاد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۳- استادیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۴- دانشجوی دکتری، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

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

مقدمه

گندم نان (*Triticum aestivum* L.) مهم‌ترین گیاه زراعی یکساله است که در سطح گسترده‌ای از جهان تولید می‌شود و غذای اصلی مردم را در بسیاری از کشورها از جمله ایران، تشکیل می‌دهد (Karajan *et al*., 2013). گندم و پس از آن ذرت دارای بیشترین سطح کشت در دنیا می‌باشند، به‌طوری که گندم ۳۰ درصد (۲۱۶ میلیون هکتار) از زمین‌های زیر کشت را به‌خود اختصاص می‌دهد. همچنین ۲۹ درصد این محصول در کشورهایی با درآمد پایین و متوسط تولید می‌شود (Erenstein *et al*., 2021). تنش‌های محیطی (زیستی و غیرزیستی) تهدیدات جدی برای تولیدات کشاورزی محسوب می‌شوند (Nakabayashi and Saito, 2015). از جمله تنش‌های غیرزیستی می‌توان به کمبود ریزمغذی‌ها در خاک اشاره کرد (Cole *et al.,* 2010). با توجه به این که یکی از ارزشمندترین منابع خوراکی جهت فراهم نمودن عناصر غذایی از جمله روی (Zn) برای تغذیه انسان، فرآورده‌های کشاورزی و به‌ویژه غلات می‌باشد، بنابراین وجود هر نوع کمبود به‌ویژه کمبود روی در خاک می‌تواند به تولید فرآورده‌هایی با کیفیت پایین منجر شود (Broadley *et al*., 2007). حدود ۵۰ درصد از خاک‌هایی که برای تولید غلات در دنیا استفاده می‌شوند، مقدار روی قابل استفاده کافی ندارند (Graham and Welch, 1996).

روی از جمله عناصر ضروری کم مصرف برای گیاه می‌باشد (Welch, 2001). کمبود روی در گیاهان، باعث کاهش زیست توده و ایجاد نکروز بینابینی و برگ‌های بد شکل می‌شود و علاوه بر عملکرد، ارزش غذایی دانه را نیز کاهش می‌دهد (Marschner, 2011). یکی از راهکارهای مقابله با کمبود عناصر کم‌مصرف در خاک‌های زراعی، کاشت ارقامی از گیاه مورد نظر است که کارایی مصرف بالایی برای جذب آن عناصر دارند. روی-کارایی به عنوان توانایی گیاه در رشد و تولید عملکرد قابل قبول تحت شرایط کمبود روی تعریف شده و بین ارقام مختلف گندم تنوع نشان می‌دهد (Graham and Rengel, 1993). عنصر روی به عنوان کاتالیزور در بسیاری از واکنش‌های شیمیایی اکسیداسیون و احیاء و در بسیاری از سیستم‌های آنزیمی حضور فعال دارد (Graham *et al*., 1992). روی تنها عنصری است که در ساختمان شش گروه آنزیمی شامل اکسیدازها، ترانسفرازها، هیدرولازها، لیازها، ایزومرازها و لیگازها مشارکت دارد (Seddigh *et al*., 2013) و یک جزء ضروری برای بیش از ۳۰۰ آنزیم از جمله آنزیم‌های آنتی اکسیدان می‌باشد (Auld, 2001). کربنیک آنهیدراز یک آنزیم حاوی روی است که کاتالیز بین بی‌کربنات و دی اکسید کربن را در سطح سلول انجام می‌دهد. آنزیم‌های کربنیک آنهیدراز به‌دلیل داشتن ساختار کریستالی به پنج خانواده تقسیم می‌شوند که با وجود تنوع در ساختار، همه آن‌ها در جایگاه فعال خود دارای عنصر روی می‌باشند (Sawaya *et al*., 2006). روی با تحت تاثیر قرار دادن فعالیت آنزیم‌های هیدروژناز و کربنیک آنهیدراز، تثبیت ساختارهای ثانویه RNA ریبوزومی، اتصال پروتئین‌های ریبوزومی به ریبوزوم و سنتز سیتوکروم، نقش بسیار مهمی در متابولیسم گیاه دارد (Parkin, 2004). در اثر کمبود روی میزان و فعالیت آنزیم کربنیک آنهیدراز تحت تاثیر قرار می‌گیرد. (Aizawa and Miyachi, 1986). کربنیک آنهیدراز آنزیمی است که برای فعالیت کاتالیزوری خود به روی نیاز دارد و به عنوان شاخصی برای کمبود روی در گیاهان از جمله برنج و گندم استفاده می‌شود (Bar-Akiva and Lavon, 1969; Bandyopadhyay *et al*., 2017).

تنش‌های مختلف محیطی سبب تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شوند. گیاهان سازوکارهای مختلفی برای کاهش اثر مخرب رادیکال‌های آزاد اکسیژن دارند (Karpinski *et al*., 2003). از جمله این سازوکارها تولید ترکیبات آنزیمی و غیرآنزیمی است، بدین صورت که مقدار گونه‌های فعال اکسیژن در سلول‌های گیاهی بوسیله فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها کنترل می‌شود (Selote *et al*., 2014). آنزیم‌های آنتی اکسیدان مولکول‌هایی هستند که قابلیت جلوگیری از اکسید شدن سایر مولکول‌ها را دارند. این مولکول‌ها با از بین بردن رادیکال‌های آزاد موجب پایان یافتن زنجیره واکنش‌های اکسیداتیو می‌شوند. سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی شامل عوامل آنزیمی مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز می‌باشد که به ترتیب رادیکال‌های سوپراکسید، هیدروژن پراکسید و پراکسیدهای آلی را در درون سلول خنثی می‌کنند (Sies *et al*., 1995). به‌دلیل درگیر بودن مستقیم عنصر روی در پروسه‌های بیان ژن و سنتز پروتئین، چنین به‌نظر می‌رسد که ممکن است تنش کمبود روی باعث غیرفعال شدن تعدادی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌شود (Cakmak., 2000).

عنصر روی علاوه بر آنزیم کربنیک آنهیدراز برای چندین آنزیم دیگر مانند اکسیداز و پراکسیداز نیز به عنوان کوفاکتور عمل می‌کند (Ayad *et al.*, 2010). آنزیم آنتی اکسیدان دیگری که گیاهان برای مقابله با تنش‌های محیطی استفاده می‌کنند پراکسیدازها می‌باشند. در گیاهان، پراکسیدازها در فرایندهای متعدد سلولی مانند پاسخ‌های رشدی و تنش دخالت دارند (Campa, 1991). در شرایط تنش فلزی، کمیت و کیفیت پراکسیدازها به طور کلی تغییر می‌کنند (Dunford, 1991). بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز در ارقام روی-کارا و روی-ناکارای برنج تحت شرایط کمبود شدید، کمبود متوسط و مقدار کافی روی نشان داده که فعالیت این آنزیم در شرایط کمبود متوسط روی به حداکثر می‌رسد (Chen *et al.*, 2009). در مطالعه بیان ژن کدکننده آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در شرایط کمبود روی در گندم نان گزارش شد که افزایش بیان این ژن در مراحل رویشی و زایشی در رقم روی-کارا بیات بطور معنی داری بیشتر از رقم روی-ناکارا هیرمند می‌باشد (Mahmoudi Malhamlu and Abdollahi Mandoulakani, 2019). همچنین رحیمی جاریحانی و عبدالهی مندولکانی (۱۴۰۰) گزارش کردند که بیشترین افزایش میزان بیان ژن کاتالاز در شرایط کمبود روی در ارقام روی-کارا گندم نان (بیات و نیک نژاد) در مرحله زایشی مشاهده می‌شود. همچنین در این مطالعه میزان بیان این ژن و ژن کدکننده آنزیم آسکوربات پراکسیداز در شرایط کمبود روی در برگ ارقام روی-کارا بطور معنی‌داری بیشتر از برگ ارقام روی-ناکارا بود. در همین مطالعه بیشترین افزایش بیان ژن کدکننده آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز نیز در شرایط کمبود روی در برگ رقم روی-کارا بیات مشاهده شد. آنزیم گلوتاتیون اس-ترانسفراز نقش مهمی در سم زدایی ترکیبات سمی نظیر 4-hydroxynenal دارد. افزایش فعالیت این آنزیم سبب کاهش آسیب به سلول و کاهش تنش اکسیداتیو می‌شود که در نهایت افزایش تحمل به تنش‌های محیطی را به دنبال خواهد داشت (Boyer, 1989). با توجه به نقش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در تحمل به تنش کمبود روی خاک و همچنین وابستگی فعالیت آنزیم کربنیک آنهیدراز به روی، تحقیق حاضر با هدف بررسی الگوی بیان نسبی ژن کد کننده آنزیم کربنیک آنهیدراز و ژن‌های کد کننده آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان پراکسیداز و گلوتاتیون اس ترانسفراز در مراحل رویشی و زایشی در ریشه و برگ ارقام گندم نان روی-کارا و روی-ناکارا تحت شرایط کمبود روی خاک انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

به منظور انجام پژوهش حاضر، آزمایشی به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه اجرا شد. فاکتور اول شامل دو سطح روی (صفر و پنج میلی‌گرم روی در کیلوگرم خاک)، فاکتور دوم شامل دو رقم گندم هامون (روی-کارا) و هیرمند (روی-ناکارا) (Baghban-Tabiat and Rasouli-Sadaghiani, 2012)، فاکتور سوم شامل دو اندام ریشه و برگ و فاکتور چهارم زمان نمونه‌برداری در دو مرحله یک ماه بعد از جوانه‌زنی (رویشی) و ۳۰ درصد سنبله‌دهی (زایشی) (Moradi and Abdollahi Mandoulakani, 2020) بود. البته لازم به توضیح است که آزمایش به‌صورت چهار فاکتوره اجرا شد، ولی با توجه به محاسبه بیان ژن به‌صورت نسبی (در تیمار کمبود نسبت به کنترل)، تجزیه داده‌ها به‌صورت سه فاکتوره انجام شد. نمونه‌های ریشه و برگ بعد از برداشت در داخل ازت مایع به فریزر ۸۰- درجه سلسیوس منتقل شد. خاک مورد استفاده (جدول ۱) از بستر رودخانه فصلی خان آرخی ارومیه که دارای کمترین مقدار Zn بود تهیه شد. بعد از غربال کردن خاک با الک ۲ میلی‌متری، ۵ بار با آب معمولی و سپس یک بار با آب دو بار تقطیر شسته تا میزان Zn خاک به کمترین حد ممکن برسد. قبل از کشت، مواد غذایی مورد نیاز به خاک محلول پاشی شد (جدول ۲). بذور ضدعفونی شده با الکل ۷۰ درصد، در عمق ۴ سانتی‌متری خاک کاشته شد و در طول فصل از آب دو بار تقطیر برای آبیاری در حد ظرفیت زراعی استفاده گردید. همچنین برای جلوگیری از کمبود نیتروژن محلول نیترات آمونیوم هر دو هفته یک بار به گلدان‌ها اضافه شد.

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

pH	EC (ds/m)	CaCo3(%)	K (mg/kg)	P (mg/kg)	Fe (mg/kg)	Mn (mg/kg)	Cu (mg/kg)	Zn (mg/kg)
7.8	0.23	5%	28	3.4	0.78	3.2	0.03	0.15

جدول ۲- ترکیب محلول غذایی مورد استفاده در این آزمایش (Moradi and Abdollahi Mandoulakani, 2020)

Table 2. Copmosion of the nutrient solution used in the study (Moradi and Abdollahi Mandoulakani, 2020)

Ingredient	Concentration (g/L)	Amount (ml/kg)
K2SO4 / KH2PO4	48.407 / 30.242	3
NH4NO3 / CaCl2.2H2O	93 / 147.16	1
MgSO4.7H2O	20.5	1
MnSO4.H2O / Na2MoO4.2H2O /CuSO4.5H2O / H3BO3	7.5 / 0.083 /1.51 / 0.333	2
ZnSO4.7H2O	13.14	1.67

استخراج RNA از برگ و ریشه گیاهان با استفاده از محلول استخراج RNX-plus™ (سیناکلون، ایران) مطابق دستورالعمل پیشنهادی شرکت سازنده انجام شد. برای ارزیابی کیفیت RNA استخراجی، از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد و نانودراپ استفاده شد. جهت سنتز cDNA از کیت RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermoscientific, USA) مطابق دستورالعمل پیشنهادی شرکت سازنده استفاده شد. قبل از سنتز cDNA برای حذف DNA ژنومی در نمونه‌های RNA استخراجی، از تیمار DNase (بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده کیت سنتز cDNA) استفاده شد. جهت بررسی صحت سنتز cDNA از واکنش‌های کنترل RT (عدم استفاده از آنزیم Reverse transcriptase در واکنش)، NTC (عدم استفاده از RNA در واکنش) و همچنین از واکنش کنترل مثبت (سنتز cDNA با استفاده از RNA ژن Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase موش موجود در کیت) مطابق دستورالعمل کیت سنتز cDNA استفاده شد. برای مطالعه بیان ژن، توالی ژن‌های کد کننده آنزیم کربنیک آنهیدراز، پراکسیداز و گلوتاتیون اس-ترانسفراز از بانک اطلاعاتی NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) استخراج و آغازگرهای اختصاصی با نرم افزارهای Fast PCR و Gene Runner طراحی شد (جدول ۳).

جهت بررسی بیان ژن، واکنش‌های Real time PCR در حجم ۱۲/۵ میکرولیتر طبق دستورالعمل کیت Maxima SYBR Green/Fluoresence qPCR Master Mix(2x) (Thermoscientific, USA) با استفاده از دستگاه Rotor gene Q-Pure Detection– Qiagen مدل ۶۰۰۰ (QIAGEN, USA) انجام گرفت. در این فرایند از ژن اکتین (Actin) به عنوان ژن مرجع (Tenea *et al*., 2011) جهت نرمال‌سازی داده‌ها استفاده شد. برنامه حرارتی جهت تکثیر ژن‌های کربنیک آنهیدراز، پراکسیداز و گلوتاتیون اس-ترانسفراز با استفاده از روش Real time PCR، به این صورت بود که فعال‌سازی ابتدایی آنزیم در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه در یک چرخه انجام شد؛ سپس ۴۰ چرخه شامل مراحل واسرشت سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و اتصال آغازگرها در دماهای اتصال مربوط به هر ژن (جدول ۳) به مدت ۳۰ ثانیه و بسط در دمای ۷۲ درجه به مدت ۴۰ ثانیه انجام شد. پس از پایان واکنش، منحنی ذوب مربوط به هر ژن رسم و صحت تکثیر محصول با استفاده از منحنی ذوب مربوط به همان ژن و همچنین با استفاده از آنالیز ژل آگارز بررسی شد. پس از به دست آوردن چرخه آستانه (Cycle of threshold: Ct) با استفاده از نرم افزار Rotor-Gene Q، میزان بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه با روش ΔΔCT محاسبه شد (Pfaffl, 2001). نرمال بودن اشتباهات و داده‌ها با روش کلموگراف-اسمیرنوف در نرم‌افزار MINITAB نسخه ۱۹ بررسی و در نهایت تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون SNK (در سطح احتمال یک درصد) در نرم‌افزار SAS انجام گرفت.

جدول ۳- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن‌های مورد مطالعه در واکنش‌های Real Time PCR

Table 3. Characteristics of the primers used for amplification of the studied genes in Real time PCR reactions

Gene	Accession number	Primer sequence	Annealing temperature (°C)	Amplicon length (bp)
Actin3	TC234027	F: GACGCACAACAGGTATCGTGTTG R: CAGCGAGGTCAAGACGAAGGATG	60	107
CAN	L36959.1	F: TGATGGGAGTCTTGTGCTTGTG R: TGCTCCACATCGGGGCGTTGAA	62	107
PRX	AB518867.1	F: TGAGTCATGGAGCGAATGCTGGTC R: TGCTGTAGCACTCGCCAACTGGAA	64	116
GST	AF002211.1	F: CGATCTACGCCAACAGGTCGTC R:CACTGGAGTCAAGGTCGGTCAGCA	64	90

CAN: Carbonic anhydrase, *PRX*: Peroxidase and *GST*: Glutathione S-transferase.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه نشان داد که برهمکنش سه جانبه رقم × بافت × مرحله نمونه‌برداری در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار است (جدول ۴). بنابراین مقایسه میانگین برای برهمکنش سه جانبه بر اساس آزمون SNK انجام گرفت.

جدول ۴- تجزیه واریانس بیان نسبی ژن‌های کربنیک آنهیدراز، پراکسیداز و گلوتاتیون اس-ترانسفراز تحت شرایط کمبود روی در ارقام روی-کارا و روی-ناکارا گندم نان

Table 4. Analysis of variance for relative expression of carbonic anhydrase (*CAN*), peroxidase (*PRX*) and glutathione S-transferase (*GST*) genes under soil Zn deficiency conditions in Zn-efficient and -inefficient bread wheat cultivars

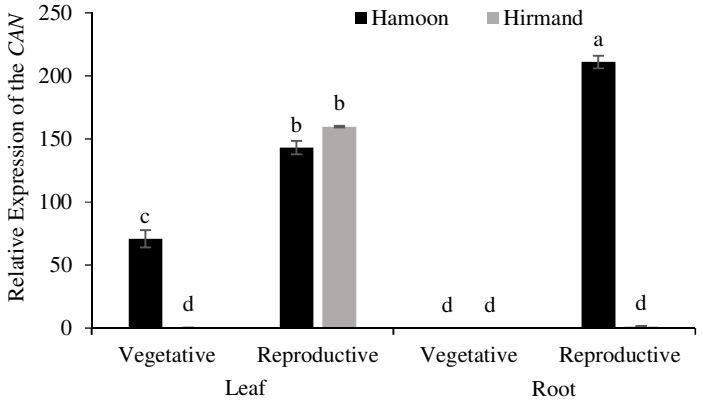
Source of variations	df	Mean of squares		
		CAN	*PRX*	*GST*
Cultivar (C)	1	17338.00**	3893.69**	632.22ns
Tissue (T)	1	6522.72**	4824.74**	21362.20**
Sampling stage (S)	1	49318.48**	14165.96**	28197.66**
C×T	1	6068.82**	12998.32**	6785.28**
C×S	1	3748.36*	5202.96**	3960.95**
T×S	1	93.53ns	3850.58**	12341.91**
C×T×S	1	22001.29**	15017.31**	13766.22**
Error	16	438.31	260.64	153.02
CV (%)	-	28.55	49.64	23.83

ns, * and **: non-significant and significant at 5% and 1% probability levels, respectively.

بیان نسبی ژن کربنیک آنهیدراز

مقایسه میانگین برهمکنش سه جانبه رقم × بافت × مرحله نمونه‌برداری بر بیان ژن کربنیک آنهیدراز نشان داد که تحت شرایط کمبود روی، بیش‌ترین میزان افزایش بیان این ژن در مرحله زایشی در ریشه رقم روی-کارای هامون مشاهده شد. این ژن در برگ نیز در مرحله زایشی بیان نسبی بالایی در هر دو رقم نشان داد، اما اختلاف بین ارقام معنی‌دار نبود، درحالی‌که در برگ در مرحله رویشی بین میزان بیان این ژن در دو رقم اختلاف معنی‌داری مشاهده شد و رقم روی-کارا (هامون) میزان بیان بیشتری را نشان داد. همچنین بیان نسبی این ژن در ریشه و در مرحله رویشی در هر دو رقم بسیار جزئی و مشابه بود (شکل ۱). کربنیک آنهیدراز از جمله آنزیم‌هایی می‌باشد که روی در ساختمان آن دخالت دارد (Helaly and Ibrahim, 2019) و در اثر کمبود روی میزان و فعالیت آن تحت تأثیر قرار می‌گیرد. بررسی مکانیسم‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی برخی ژنوتیپ‌های گندم تحت شرایط کمبود روی نشان داد که بیشترین فعالیت آنزیم کربنیک آنهیدراز در ژنوتیپ‌های روی-کارا Kirgiz و Dagdas مشاهده شد (Hacisalihoglu *et al*., 2003).

افزایش بیان بالای این ژن در برگ هر دو رقم در مرحله زایشی صرف نظر از روی-کارا بودن یا نبودن به نقش مشارکتی کربنیک آنهیدراز در فعالیت فتوسنتز برمی‌گردد. به‌عبارت دیگر آنزیم کربنیک آنهیدراز برای نقل و انتقال گاز کربنیک در فرآیند فتوسنتز شرکت دارد (Ayad *et al*., 2010). در گیاه برنج گزارش شد که فعالیت آنزیم کربنیک آنهیدراز در ساقه در مراحل اولیه رشد به طور قابل توجهی پس از سلب روی از خاک کاهش می‌یابد، به طوری که تقریباً ۱۹ درصد از محتوای آنزیم موجود در گیاه کاهش یافت که موجب کند شدن فرآیند رشد بوته‌ها به‌دلیل عدم فتوسنتز کافی شد (Bandyopadhyay *et al*., 2017). مطابق با این یافته‌ها به نظر می‌رسد که افزایش بیان ژن کربنیک آنهیدراز در پژوهش حاضر در برگ رقم روی-کارا نسبت به رقم روی-ناکارا در مرحله رویشی به‌دلیل قابلیت بالای ارقام روی-کارا در جذب و انتقال روی به اندام‌های هوایی مانند برگ باشد. همچنین بررسی فعالیت آنزیم کربنیک آنهیدراز تحت شرایط کمبود روی در برگ برنج نشان داد که سطوح mRNA این آنزیم تحت شرایط کمبود روی ۱۳ درصد نسبت به شاهد کاهش یافته است (Sasaki *et al*., 1998).



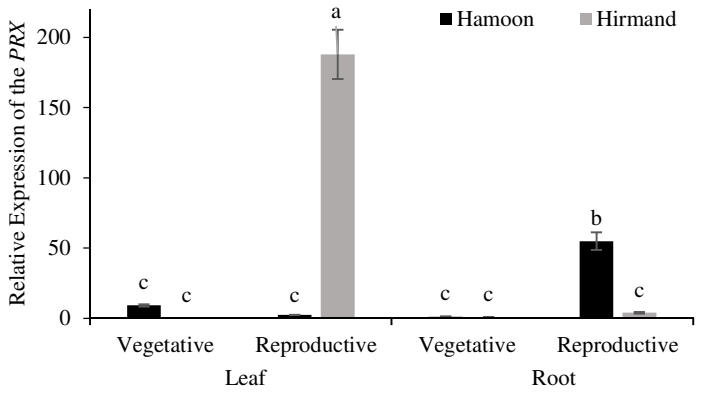
شکل ۱- مقایسه میانگین اثر متقابل رقم × بافت × مرحله نمونه‌برداری بر بیان ژن کربنیک آنهیداز (*CAN*) در دو رقم هامون (روی-کارا) و هیرمند (روی-ناکارا) گندم نان تحت شرایط کمبود روی (ستون‌های دارای حروف مشترک، بر اساس آزمون چند دامنه‌ای SNK اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد ندارند)

Figure 1- Mean comparison of cultivar × tissue × sampling stage on the relative expression of carbonic anhydrase (*CAN*) gene in Hamoon (Zn-efficient) and Hirmand (Zn-inefficient) bread wheat cultivars (Columns with the common letters on the graph show no significant difference based on SNK test at %1 probability level

بیان نسبی ژن پراکسیداز

بر اساس نتایج مقایسه میانگین برهمکنش رقم × بافت × مرحله نمونه‌برداری بر بیان نسبی ژن پراکسیداز، بیشترین میزان افزایش بیان این ژن (۱۸۷ برابر شاهد) تحت شرایط کمبود روی در برگ رقم روی-ناکارا (هیرمند) در مرحله زایشی مشاهده شد. همچنین نتایج نشان داد که افزایش بیان ژن پراکسیداز در ریشه رقم روی-کارای هامون در مرحله زایشی بطور معنی داری بیشتر از رقم روی-ناکارا هیرمند می‌باشد. این ژن در مرحله رویشی در ریشه هر دو رقم بیان بسیار اندکی نشان داد ولی در همین مرحله در برگ رقم روی-کارا افزایش ۹ برابری نشان داد (شکل ۲). پراکسیداز، متالوآنزیم درگیر در دفاع سلولی بر علیه تنش اکسیداتیو می‌باشد و گزارش شده است که این آنزیم با فعالیت بیش‌تر در ارقام روی-کارای گندم در شرایط کمبود روی، قابلیت بیش‌تری در حذف انواع گونه‌های فعال اکسیژن دارند (Niazkhani *et al*., 2019). چاکماک و مارشنر (Cakmak and Marschner, 1988) بیان کردند که عنصر روی برای فعالیت بیشتر آنزیم‌های آنتی اکسیدان درگیر در سم‌زدایی پراکسید هیدروژن از جمله پراکسیداز، کاتالاز و گلوتاتیون رداکتاز مورد نیاز است. در نخود فرنگی (Pandey *et al*., 2012) و نخود سیاه (Gupta *et al*., 2011) کاهش فعالیّت آنزیم پراکسیداز در ارقام روی-ناکارا عاملی برای افزایش تجمع آسکوربات و پراکسید هیدروژن در این ارقام گزارش شده است. با توجه به نتایج به‌دست آمده در پژوهش حاضر احتمال می‌رود که افزایش بیان ژن کد

کننده آنزیم پراکسیداز در ریشه رقم روی-کارا در مرحله زایشی و در برگ همین رقم در مرحله رویشی، به‌دلیل فعالیت آنتی اکسیدانی این آنزیم می‌باشد که منجر به غیرفعال شدن رادیکال‌های آزاد اکسیژن تولید شده در اثر کمبود روی می‌شود، به‌طوری‌که در مطالعه‌ای در ذرت افزایش بیان ژن پراکسیداز تحت شرایط کمبود روی در ریشه گزارش شده است که موجب سرکوب گونه‌های فعال اکسیژن در ریشه ذرت شد (Subramanian *et al*., 2011). در مطالعه حاضر بیشترین میزان افزایش بیان این ژن در برگ رقم روی-ناکارای هیرمند در مرحله زایشی بود. چن و همکاران (Chen *et al*., 2009) گزارش کردند که افزایش قابل توجه فعالیت آنزیم پراکسیداز در گندم در شرایط کمبود روی، به‌خاطر قابلیت بالای این آنزیم در حذف انواع گونه‌های فعال اکسیژن است. همچنین افزایش بیان بالای این ژن در رقم روی-ناکارا احتمالاً به‌دلیل نقش این ژن در سایر فعالیت‌های غیر دفاع آنتی‌اکسیدانی مانند تنظیم رشد و کنترل متابولیسم هورمونی و دیواره سلولی باشد (Campa, 1991). دلیل دیگر این افزایش در رقم ناکارا احتمالا می‌تواند به علت تولید بالای رادیکال‌های آزاد در رقم ناکارا نسبت به رقم کارا و بنابراین نیاز بیشتر رقم ناکارا به این آنزیم در حذف رادیکال‌های آزاد باشد. همچنین ممکن است رقم کارا برای کنترل رادیکال‌های آزاد در گیاه تحت شرایط کمبود روی از آنزیم های دیگری استفاده کند. مطابق با نتایج پژوهش حاضر رحیمی جاریحانی و عبدالهی مندولکانی (Rahimi-Jarihani and Abdollahi-Mandoulakani, 2021) در بررسی بیان ژن‌های کدکننده آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در شرایط کمبود روی خاک در گندم نان، میزان بیان ژن‌های کدکننده آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز در برگ بیشتر از ریشه بود. در مطالعه آسیب اکسیداتیو ناشی از کمبود روی در ریشه و برگ گندم گزارش شد که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در غلظت زیاد Zn در برگ افزایش می‌یابد (Li *et al*., 2013).



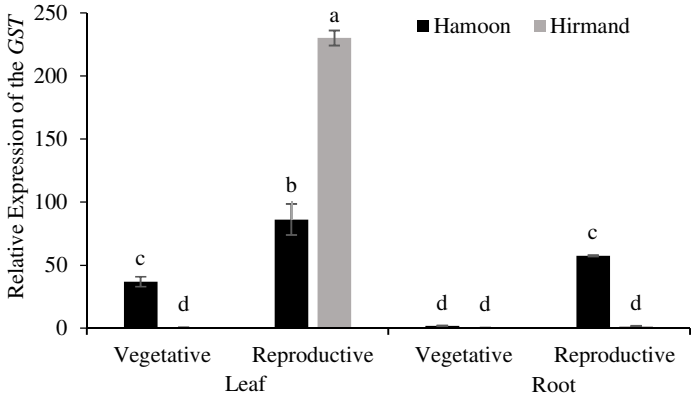
شکل ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل رقم × بافت × مرحله نمونه‌برداری بر بیان ژن پراکسیداز (*PRX*) در دو رقم هامون (روی-کارا) و هیرمند (روی-ناکارا) گندم نان تحت شرایط کمبود روی (ستون‌های دارای حروف مشترک، اختلاف معنی‌داری بر اساس آزمون چند دامنه‌ای SNK در سطح احتمال یک درصد ندارند)

Figure 2- Mean comparison of cultivar × tissue × sampling stage on the relative expression of peroxidase (*PRX*) gene in Hamoon (Zn-efficient) and Hirmand (Zn-inefficient) bread wheat cultivars (Columns with the common letters on the graph show no significant difference based on SNK test at %1 probability level

بیان نسبی ژن گلوتاتیون اس-ترانسفراز

نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل رقم × بافت × مرحله نمونه‌برداری بر بیان ژن گلوتاتیون اس-ترانسفراز نشان داد که در شرایط کمبود روی بیش‌ترین میزان افزایش بیان این ژن (۲۳۰ برابر شاهد) مربوط به برگ رقم روی-ناکارا (هیرمند) در مرحله زایشی بود هر چند بیان این ژن در همین مرحله در برگ رقم روی-کارا نیز ۸۶ برابر نسبت به شاهد افزایش یافت. چنانچه در خصوص بیان ژن کدکننده آنزیم پراکسیداز نیز توضیح داده شد احتمالا افزایش بیان قابل توجه این ژن در رقم ناکارا به‌دلیل تولید بالای رادیکال‌های آزاد تحت شرایط کمبود روی و بنابراین نیاز بیشتر این رقم به آنزیم گلوتاتیون اس-ترانسفراز برای

حذف رادیکال‌های آزاد باشد. در مرحله رویشی، بیان این ژن در برگ رقم روی-کارا بطور معنی‌داری بیشتر از رقم روی-ناکارا بود. همچنین در ریشه در مرحله رویشی تفاوت معنی‌داری به لحاظ بیان این ژن بین دو رقم مشاهده شد ولی در مرحله زایشی بیان این ژن در ریشه رقم روی-کارا بطور معنی داری بیشتر از رقم روی-ناکارا بود. (شکل ۳). معمولاً ژنوتیپ‌های روی-ناکارا یک پاسخ منفی به کمبود روی نشان می‌دهند، بدین صورت که در این ژنوتیپ‌ها، کاهش روی قابل دسترس باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان شده و در نتیجه موجب افزایش تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن گردیده که آن‌هم به نوبه خود سبب آسیب اکسیداتیو در سلول گیاهی و اخلال در رشد گیاهان می‌شود (Pandey *et al*., 2012). آنزیم گلوتاتیون اس-ترنسفراز در تمامی مراحل رویشی و زایشی گیاهان و در تمام بافت‌های گیاهی وجود دارد (McGonigle *et al*., 2000). افزایش بیان ژن کد کننده این آنزیم در ریشه رقم روی-کارا در مرحله زایشی احتمالا بدلیل قابلیت ارقام روی-کارا در جذب روی از خاک می‌باشد که موجب دسترسی بیشتر این آنزیم به روی برای انجام عمل کاتالیزوری به منظور مقابله با تنش‌های اکسیداتیو می‌باشد. طبق تحقیقی که در گیاه تنباکو انجام گرفت نشان داده شد که افزایش بیان بیش از حد ژن گلوتاتیون اس-ترنسفراز موجب مقاومت بیشتری در گیاهچه‌های تنباکو به منظور مقابله با تنش اکسیداتیو می‌شود (Roxas *et al*., 1997). همچنین انتقال ژن کد کننده آنزیم گلوتاتیون اس-ترنسفراز از گوجه فرنگی به مخمر نشان داد که بیان این ژن در مخمر، موجب مقاومت آن در برابر تنش‌های اکسیداتیو می‌شود (Kampranis *et al*., 2000).



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل رقم × بافت × مرحله نمونه‌برداری بر بیان ژن گلوتاتیون اس- ترانسفراز (*GST*) در دو رقم هامون (روی-کارا) و هیرمند (روی-ناکارا) گندم نان تحت شرایط کمبود روی (ستون‌های دارای حروف مشترک، اختلاف معنی‌داری بر اساس آزمون چند دامنه‌ای SNK در سطح احتمال یک درصد ندارند)

Figure 3- Mean comparison of cultivar × tissue × sampling stage on the relative expression of glutathione S-transferase (*GST*) gene in Hamoon (Zn-efficient) and Hirmand (Zn-inefficient) bread wheat cultivars (Columns with the common letters on the graph show no significant difference based on SNK test at %1 probability level

نتیجه گیری کلی

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که بیش‌ترین میزان افزایش بیان ژن کربنیک آنهیدراز تحت شرایط کمبود روی در ریشه رقم روی- کارا (هامون) در مرحله زایشی مشاهده شد، در حالی‌که بیش‌ترین میزان افزایش بیان ژن‌های پراکسیداز و گلوتاتیون اس-ترانسفراز تحت شرایط کمبود روی در برگ رقم روی-ناکارا (هیرمند) در مرحله زایشی مشاهده شد. از طرف دیگر هر سه ژن بررسی شده در این تحقیق، افزایش بیان معنی‌داری در ریشه رقم روی-کارا در مرحله زایشی نسبت به رقم روی-ناکارا نشان دادند و میزان بیان نسبی هر سه ژن در مرحله زایشی به‌طور معنی‌داری بیشتر از مرحله رویشی بود. به‌طور کلی، افزایش میزان بیان ژن‌های مورد مطالعه در ریشه ارقام روی-کارا نسبت به ارقام روی-ناکارا نشان داد که در مرحله زایشی و بلوغ، ارقام روی-ناکارا می‌توانند به‌طور

مؤثرتری نسبت به ارقام ناکارا در برابر آسیب‌های حاصل از تنش در شرایط کمبود روی مقابله نماید.

تضاد منافع

نویسنده (گان) تایید می‌کنند که این تحقیق در غیاب هر گونه روابط تجاری یا مالی که می‌تواند به‌عنوان تضاد منافع بالقوه تعبیر شود، انجام شده است.

رعایت اخلاق در نشر

نویسنده (گان) اعلام می‌کنند که در نگارش این مقاله به‌طور کامل از اخلاق نشر از جمله سرقت ادبی، سوء رفتار، جعل داده‌ها و یا ارسال و انتشار دوگانه، پیروی کرده‌اند. همچنین این مقاله حاصل یک کار تحقیقاتی اصیل بوده و تا کنون به‌طور کامل به هیچ زبانی و در هیچ نشریه یا همایشی چاپ و منتشر نشده و هیچ اقدامی نیز برای انتشار آن در هیچ نشریه یا همایشی صورت نگرفته و نخواهد گرفت.

اجازه انتشار مقاله

نویسنده (گان) با چاپ این مقاله به صورت دسترسی باز موافقت کرده و کلیه حقوق استفاده از محتوا، جدول‌ها، شکل‌ها، تصویرها و غیره را به ناشر واگذار می‌کنند.

References

Aizawa, K. and Miyachi, S. 1986. Carbonic anhydrase and CO_2 concentrating mechanisms in microalgae and cyano-bacteria**. Federation of European Microbiological Societies** 39: 215-233.

Auld, D. S. 2001. Zinc coordination sphere in biochemical zinc sites. **Biometals** 14: 271-313.

Ayad, H. S., Reda, F. and Abdalla, M. S. A. 2010. Effect of putrescine and zinc on vegetative growth, photosynthetic pigments, lipid peroxidation and essential oil content of geranium (*Pelargonium graveolens* L.). **World Journal of Agricultural Sciences** 6 (5): 601-608.

Bar-Akiva, A. and Lavon, R. U. T. H. 1969. Carbonic anhydrase activity as an indicator of zinc deficiency in citrus leaves. **Journal of Horticultural Science** 44 (4): 359-362.

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).

Bandyopadhyay, T., Mehra, P., Hairat, S. and Giri, J. 2017. Morpho-physiological and transcriptome profiling reveal novel zinc deficiency-responsive genes in rice. **Functional and Integrative Genomics** 17 (5): 565-581.

Boyer, T. D. 1989. The glutathione S-transferases: An update. **Hepatology** 9 (3): 486-496.

Broadley, M. R., White, P. J., Hammond, J. P., Zelko, I. and Lux, A. 2007. Zinc in plants. **New Phytology** 173: 677-702.

Cakmak, I. 2000. Possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species. **The New Phytologist** 146 (2): 185-205.

Cakmak, I. and Marschner, H. 1988. Enhanced superoxide radical production in roots of zinc deficient plants. **Journal of Experimental Botany** 39 (10): 1449-1460.

Campa, A. 1991. Biological roles of plant peroxidases: known and potential function. In: Everse, J. and Grisham, M. B. (Eds.). Peroxidases in chemistry and biology. Vol. 2. CRC Press. pp: 25-50.

Chen, W. R., He, Z. L., Yang, X. E. and Feng, Y. 2009. Zinc efficiency is correlated with root morphology, ultrastructure, and antioxidative enzymes in rice. **Journal of Plant Nutrition** 32(2): 287-305.

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.

Dunford, H. B. 1991. Horseradish peroxidase: Structure and kinetic properties. In: Everse, J. and Grisham, M. B. (Eds.). Peroxidases in chemistry and biology. Vol. 2. CRC Press. pp: 1-23.

Erenstein, O., Chamberlin, J. and Sonder, K. 2021. Estimating the global number and distribution of maize and wheat farms. **Global Food Security** 30: 100558.

Graham, R. D. and Rengel, Z. 1993. Genotypic variation in zinc uptake and utilization by plants. In: Robson, A. D. (Ed.). Zinc in soils and plants. Springer, Dordrecht. pp: 107-118.

Graham, R. D. and Welch, R. M. 1996. Breeding for staple food crops with high micronutrient density. Project paper. International Food Policy Research Institute. 79 p.

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.

Gupta, B., Pathak, G. C. and Pandey, N. 2011. Induction of oxidative stress and antioxidant responses in Vigna mungo by zinc stress. **Russian Journal of Plant Physiology** 58 (1): 85-91.

Hacisalihoglu, G., Hart, J. J., Wang, Y. H., Cakmak, I. and Kochian, L. V. 2003. Zinc efficiency is correlated with enhanced expression and activity of zinc-requiring enzymes in wheat. **Plant Physiology** 131 (2): 595-602.

Helaly, A. A. E. and Ibrahim, F. R. 2019. Influence of iron, zinc and tyrosine acid on growth, yield components and chemical constituents of *Hibiscus sabdariffa* L. plant. **Chemical Analysis** 44 (34-10): 21-30.

Kampranis, S. C., Damianova, R., Atallah, M., Toby, G., Kondi, G., Tsichlis, P. N. and Makris, A.M. 2000. A novel plant glutathione S-transferase/peroxidase suppresses bax lethality in yeast. **Journal of Biological Chemistry** 275: 29207-29216.

Karpinski, S., Gabrys, H., Mateo, A., Karpinska, B. and Mullineaux, P. M. 2003. Light perception in plant diseasedefense signalling. **Current Opinion in Plant Biology** 6: 390-396.

Li, Y., Xie, S., Chen, Z. L., Xu, S. N. and Zhang, L. H. 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 (2): 358-362.

Mahmoudi-Malhamlu, F. and Abdollahi-Mandoulakani, B. 2019. Enhanced expression of superoxide dismutase, phenylalanine ammonia-lyase and *bZIP33* transcription factor encoding genes under Zn deficiency conditions in bread wheat (*Triticum aestivum L.*). **Cereal Research** 9 (1): 17-26. (In Persian with English Abstract).

Marschner, H. 2011. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, Cambridge, Massachusetts, USA. 89 p.

McGonigle, B., Keeler, S. J., Lau, S. M. C., Koeppe, M. K. and O'Keefe, D. P. 2000. A genomics approach to the comprehensive analysis of glutathione S-transferase gene family in soybean and maize**. Plant Physiology** 124: 1105-1120.

Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. and Van-Breusegem, F. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in Plant Science** 9 (10): 490-498.

Moradi, K. and Abdollahi Mandoulakani, B. 2020. Expression pattern of *HMA1*, *HMA2* and *HMA9* genes under Zn deficiency conditions in bread wheat cultivars with different Zn uptake efficiency. **Cereal Research** 9 (4): 347-357. (In Persian with English Abstract).

Nakabayashi, R. and Saito, K. 2015. Integrated metabolomics for abiotic stress responses in plants. **Current Opinion in Plant Biology** 24: 10-16.

Niazkhani, S. M., Abdollahi-Mandoulakani, B., Jafari, M. and Rasouli-Sadaghiani, M. 2019. Effect of soil zinc deficiency on antioxidant enzymes activity and some biochemical parameters in bread wheat. **Crop Physiology** 11 (41): 27-5. (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.

Parkin, G. 2004. Synthetic analogues relevant to the structure and function of zinc enzymes. **Chemical Reviews** 104 (2): 699-767.

Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research** 29 (9): 45-45.

Rahimi Jarihani, L. and Abdollahi Mandoulakani, B. 2021. Expression pattern of catalase, ascorbate peroxidase and polyphenol oxidase encoding genes under soil Zn deficiency in bread wheat. **Cellular and Molecular Researches (Iranian Journal of Biology)** 34 (1): 105-116. (In Persian with English Abstract).

Rengel, Z. 1995. Carbonic anhydrase activity in leaves of wheat genotypes differing in Zn efficiency. **Journal of Plant Physiology** 147 (2): 251-256.

Roxas, V. P., Smith, R. K., Allen, E. R. and Allen, R. D. 1997. Over expression of glutathione S-transferase / glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. **Nature Biotechnology** 15: 988-991.

Sasaki, H., Hirose, T., Watanabe, Y. and Ohsugi, R. 1998. Carbonic anhydrase activity and CO2-transfer resistance in Zn-deficient rice leaves. **Plant Physiology** 118 (3): 929-934.

Sawaya, M. R., Cannon, G. C., Heinhorst, S., Tanaka, S., Williams, E. B., Yeates, T. O. and Kerfeld, C. A. 2006. The structure of β-carbonic anhydrase from the carboxysomal shell reveals a distinct subclass with one active site for the price of two. **Journal of Biological Chemistry** 281 (11): 7546-7555.

Seddigh, M., Khoshgoftarmanesh, A. H. and Ghasemi, S. 2013. The effectiveness of synthesized zinc-amino chelates in supplying zinc for wheat. **Journal of Crop Production and Processing** 3 (9): 177-187.

Selote, D. S. and Khanna-Chopra, R. 2010. Antioxidant response of wheat roots to drought acclimation. **Protoplasma** 245: 153-163.

Sies, H. and Stahl, W. 1995. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. **The American Journal of Clinical Nutrition** 62 (6): 1315S-1321S.

Subramanian, K. S., Tenshia, J. V., Jayalakshmi, K. and Ramachandran, V. 2011. Antioxidant enzyme activities in arbuscular mycorrhizal (*Glomus intraradices*) fungus inoculated and non-inoculated maize plants under zinc deficiency. **Indian Journal of Microbiology** 51 (1): 37-43.

Tenea, G. N., Bota, A. P., Raposo, F. C. and Maquet, A. 2011. Reference genes for gene expression studies in wheat flag leaves grown under different farming conditions. **BioMed Central Research Notes** 4 (1): 373.

Welch, R. M. 2001. Impact of mineral nutrients in plants on human nutrition on a worldwide scale. Plant Nutrition-Food Security and Dordrecht, Netherlands. pp: 258-284.

University of Guilan
Faculty of Agricultural Sciences

doi: 10.22124/CR.2022.20971.1697

(Research Article)

Cereal Research
Vol. 11, No. 3, Autumn 2021 (193-204)

Expression pattern of genes encoding carbonic anhydrase, peroxidase and glutathione S-transferase enzymes in bread wheat under zinc deficiency conditions

Sahar Salehi[1], Babak Abdollahi Mandoulakani[2*], Hadi Alipour[3] and Kamran Moradi Gangachin[4]

Received: July 31, 2021 Accepted: November 3, 2021

Abstract

One of the plant strategies against stresses, especially micronutrient deficiencies, is the use of enzymatic antioxidant defense system. To investigate the effect of Zn deficiency on the genes expression of carbonic anhydrase (*CAN*), peroxidase (*PRX*) and glutathione S-transferase (*GST*) enzymes in Zn-efficient (Hamun) and -inefficient (Hirmand) bread wheat cultivars, a factorial experiment was carried out in completely randomized design (CRD) with three replications in greenhouse. The cultivars were grown in Zn deficient (zero) and adequacy (5 mg Zinc per kg soil) conditions and relative expression of the studied genes was measured using real time PCR technique in root and leaf of the cultivars at two growth stages, one month after germination (vegetative stage) and 30 % of flowering (reproductive stage). The results revealed the highest increase in *CAN* (211 fold) expression in the root of Zn-efficient (Hamoon) cultivar in the reproductive stage. A realtively high expression of this gene was observed in the leaf of both cultivars in the reproductive stage. The highest increase in *PRX* (187 fold) and *GST* (230 fold) expression was observed in the leaf of Zn-inefficient (Hirmand) cultivar at the reproductive stage. Generally, the expression of all three studied genes in the root of Zn-efficient (Hamoon) cultivar in the reproductive stage was higher than those of Zn-inefficient (Hirmand) cultivar. Also, the *CAN* expression in the leaf of Zn-efficient cultivar was significantly higher than that of Zn-inefficient cultivar. In conclusion, the results of the current study show that in the reproductive stage, Zn-efficient cultivars can effectively face against stress-induced damages through increasing the expression of the above-mentioned genes in the roots under Zn deficiency conditions.

Keywords: Antioxidant enzymes, Real time PCR, Zn-efficient cultivars, Zn-inefficient cultivar

1. M. Sc. Student, Dept. of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
2. Prof, Dept. of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
3. Assist. Pro., Dept. of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
4. Ph.D. Student, Dept. of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
[*] Corresponding author: b.abdollahi@urmia.ac.ir