

The Effect of Iron Deficiency on the Relative Expression of Genes Encoding Catalase, Ascorbate Peroxidase and Polyphenol Oxidase Enzymes in Bread Wheat

Fariba Ranhbar¹, Babak Abdollahi Mandoulakani^{2,*} and Raheleh Ghasemzadeh³

1- M.Sc. Student, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

2- Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

3- Assistant Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

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

Citation: Ranhbar, F., Abdollahi Mandoulakani, B. and Ghasemzadeh, R. (2023). The effect of iron deficiency on the relative expression of genes encoding catalase, ascorbate peroxidase and polyphenol oxidase enzymes in bread wheat. *Plant Genetic Researches*, 10(1): 145-156. <http://dx.doi.org/10.22034/pgr.10.1.9>

(Received: January 2, 2023; Final Revised: July 18, 2023; Accepted: July 26, 2023; Published online: September 21, 2023)

Extended abstract

Introduction

Bread wheat is one of the fundamental sources of food supply in the world. Bread wheat has the biggest share in providing the human diet calories. Increasing in human population has led to a higher demand for wheat productivity in the world. Abiotic stresses, including micronutrient deficiencies, are among the most important limitation for wheat production. It is estimated that more than 50% of yield reduction is caused by direct impacts of such stresses. Although iron is required by plants in small amounts, it plays an essential role in the structure of chloroplasts and the growth and development of plants. Iron and zinc, as cofactors for some antioxidant enzymes, increase the activity of these enzymes and plays an important role in modulating free radicals and their destructive effects in membrane systems and consequently increase plant tolerance against drought stress. Iron deficiency stress in plants is associated with the creation of various types of reactive oxygen species (ROS), which in turn induces oxidative stress in the plant. To reduce the destructive effects of free oxygen radicals, plants develop various mechanisms, including the production of enzymatic and non-enzymatic antioxidant compounds. Antioxidant enzymes such as catalase, peroxidase, superoxide dismutase and polyphenol oxidase are activated under stress conditions and scavenge the ROS. An increase in the activity of different antioxidant enzymes as well as up-regulation of antioxidant encoding genes in response to the micronutrients deficiency have been reported in many studies.

Materials and methods

To evaluate the expression of genes encoding catalase, ascorbate peroxidase and polyphenol oxidase enzymes under iron deficiency conditions in Fe- efficient (Pishtaz) and -inefficient (Falat) bread wheat cultivars, a factorial experiment based on a completely randomized design (CRD) was conducted in three replications. Cultivars were planted at two levels of iron: less than 1.5 (iron deficiency) and 10 (iron sufficiency) mg/kg soil. The expression levels of the antioxidant encoding genes were measured using Real-time PCR technique in the leaves and roots of the cultivars under iron deficiency conditions compared to the control conditions.

Results and discussion

The relative expression level of in the reproductive stage of both cultivars was significantly increased in the root but decreased in the leaves. The highest increase in the expression of catalase coding gene was observed in the



©2023 The author(s). This is an open access article distributed under [Creative Commons Attribution 4.0 International License \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source.

roots of Fe- efficient cultivar (Pishtaz) in the reproductive stage. Also, the expression level of this gene was decreased in the root of both cultivars during the vegetative stage, but increased in the leaves of the Fe- efficient cultivar at the same stage and remained unchanged in the ineffective cultivar. The increase in the relative expression of the catalase coding gene in the root during the reproductive stage is probably caused by the activity of the catalase enzyme to remove ROS produced by stress. In the present study, the expression of catalase gene in the reproductive stage in the roots of both cultivars was significantly increased. The expression level of ascorbate peroxidase gene in the vegetative stage in the roots and leaves of the Fe- effective variety was significantly increased, but it was decreased in the Fe- inefficient cultivar. Ascorbate peroxidase is a chloroplast enzyme that participates in scavenging the chloroplastid hydrogen peroxide. As a result of the decrease in the activity of this enzyme, the amount of hydrogen peroxide in the chloroplast increases and the amount of chlorophyll and carotenoids in the plant decreases, leading to a decrease in the amount of photosynthesis. Since Fe is involved in the biosynthesis of chlorophyll, iron deficiency directly leads to a decrease in the amount of chlorophyll in the plant. The increased expression of ascorbate peroxidase coding gene in the root during the reproductive stage in both cultivars and in the leaves and roots of the Fe-efficient cultivar during the vegetative stage can be due to the role of this enzyme in the detoxification of reactive oxygen species under Fe deficiency stress conditions. The increase in the expression of ascorbate peroxidase coding gene in the vegetative stage in the roots and leaves of the Fe-efficient variety compared to the Fe-inefficient cultivar is probably due to the efficiency of the Pishtaz cultivar in absorbing Fe under Fe deficiency conditions and making this element available to the ascorbate peroxidase enzyme. According to the results, the expression level of polyphenol oxidase coding gene expression in the leaf in the vegetative stage under Fe deficiency conditions was increased, whereas the increase in expression level in the root was not significant at the same stage. Also, the expression of this gene in the reproductive stage in both leaf and root tissues showed a significant decrease compared to the controls.

Conclusion

The results of this research showed that under iron deficiency conditions, the relative expression of the catalase gene in the roots of both Fe-efficient (Pishtaz) and -inefficient (Falat) cultivars was significantly increased, and this increase in the Pishtaz cultivar was more significant than Falat cultivar. The expression level of polyphenol oxidase gene in the vegetative stage in the leaf increased significantly in both cultivars. At the same stage, the expression level of polyphenol oxidase gene in the root was also increased. The highest increase in the expression of ascorbate peroxidase gene was observed under Fe deficiency conditions in the roots of Falat cultivar at the reproductive stage. The expression level of this gene was increased in the root of Pishtaz cultivar at this stage.

Keywords: Antioxidant enzymes, Fe deficiency, Gene expression, Wheat



تأثیر کمبود آهن بر بیان نسبی ژن‌های کدکننده آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز در گندم نان

فریبا رنجبر^۱، بابک عبدالمی مندولکانی^{۲*} و راحله قاسم‌زاده^۳

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

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

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

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۱۲؛ تاریخ آخرین ویرایش: ۱۴۰۲/۰۴/۲۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۵/۰۴؛ تاریخ انتشار برخط: ۱۴۰۲/۱۱/۳۰)

چکیده

به منظور ارزیابی الگوی بیان ژن‌های کدکننده آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز (Catalase)، آسکوربات پراکسیداز (Ascorbate peroxidase) و پلی فنل اکسیداز (Polyphenol oxidase) تحت شرایط کمبود (کمتر از ۱/۵ میلی گرم آهن در کیلوگرم خاک) نسبت به شاهد (۱۰ میلی گرم آهن در کیلوگرم خاک) در ارقام آهن-کارا (پیش‌تاز) و آهن-ناکارا (فلات) گندم نان، آزمایشی به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه اجرا شد. ارقام گندم نان در شرایط کمبود و کفایت آهن خاک کشت و میزان بیان نسبی ژن‌های کدکننده سه آنزیم فوق در برگ و ریشه گندم در دو مرحله رویشی و زایشی با استفاده از روش Real-time PCR اندازه‌گیری شد. نتایج این پژوهش نشان داد که میزان بیان نسبی ژن کاتالاز در مرحله زایشی در ریشه هر دو رقم به طور قابل توجهی افزایش یافت ولی افزایش بیان در رقم آهن-کارا بیشتر از رقم آهن-ناکارا بود. میزان بیان نسبی این ژن در برگ در همین مرحله و در ریشه در مرحله رویشی در هر دو رقم کاهش یافت. میزان بیان نسبی ژن آسکوربات پراکسیداز در مرحله زایشی در ریشه رقم آهن-ناکارای فلات بیشتر از رقم آهن-کارا افزایش یافت. در مرحله رویشی در برگ و ریشه، بیان این ژن در رقم آهن-کارا افزایش ولی در رقم آهن-ناکارا کاهش یافت. میزان بیان نسبی ژن پلی فنل اکسیداز در مرحله رویشی در شرایط کمبود آهن در برگ تقریباً سه برابر ریشه افزایش یافت در حالی که بیان نسبی این ژن در مرحله زایشی در برگ نسبت به کنترل کاهش یافت. با افزایش بیان هر دو ژن کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در ریشه هر دو رقم در مرحله زایشی در شرایط کمبود آهن، به نظر می‌رسد گیاه در مرحله پر شدن دانه با انتقال آهن بیشتر به دانه سعی در کاهش اثرات تنش و حفظ عملکرد دارد. یافته‌های مطالعه حاضر درک ما را در مورد نقش ژن‌های کدکننده آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در مقابله با تنش کمبود آهن خاک افزایش می‌دهد.

واژگان کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، بیان ژن، کمبود آهن، گندم

مقدمه

گندم نان با نام علمی *Triticum aestivum* L. از تیره غلات (Poaceae)، یک گیاه هگزاپلوئید ($2n=6x=42$) و مهم‌ترین گیاه زراعی یک‌ساله است (Hossain et al., 2012) که یکی از منابع اساسی تأمین غذا در سراسر جهان محسوب می‌شود. کشت آن حدود ۸۰۰۰ سال پیش از خاورمیانه آغاز شد و در سطح جهانی گسترش یافت (Hao et al., 2017). گندم به‌عنوان یک محصول غذایی مهم در میان تمام غلات، بالاترین درصد کالری را در رژیم غذایی دارد و حدود ۲۹ درصد از کل تولید غلات در سال ۲۰۱۵ را به خود اختصاص داده است (Winfield et al., 2018). گندم یکی از منابع اصلی تأمین کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها، فیبرها، اسیدهای آمینه و ویتامین‌ها می‌باشد و تقریباً ۲۰ درصد انرژی و ۲۵ درصد نیازهای پروتئینی جمعیت جهان را تأمین می‌کند (Reddy and Hodges, 2000; FAO, 2019). این گیاه در بین غلات، بیشترین سازگاری را نسبت به شرایط مختلف اقلیمی دارد (Hasheminasab et al., 2014).

افزایش نرخ جمعیت باعث افزایش تقاضا برای بهره‌وری گندم در سطح جهان شده است. با این حال، تنش‌های مختلف زیستی و غیرزیستی عامل اصلی محدودیت در عملکرد گندم می‌باشند (Wani and Sah, 2014). تنش‌های غیرزیستی بزرگ‌ترین محدودیت برای تولید محصولات کشاورزی با ارزش از جمله گندم می‌باشند، به طوری که بیش از ۵۰ درصد کاهش عملکرد، نتیجه اثر مستقیم این تنش‌ها است (Munns and Tester, 2008). گندم نیز مانند سایر گیاهان زراعی در طول دوره رشد با محدودیت‌های محیطی زیادی مواجه می‌شود که از جمله این محدودیت‌ها می‌توان به کمبود عناصر کم‌مصرف اشاره کرد (Abdoli and Esfandiari, 2014). وجود این عناصر در حد کفایت برای تکمیل چرخه زندگی و رشد گیاهان ضروری می‌باشد. با وجود نیاز اندک گیاهان به عناصر کم‌مصرف، این عناصر نقش اساسی در تغذیه، واکنش‌های آنزیمی، فرایندهای متابولیکی و مقاومت گیاهان در برابر بیماری‌ها و شرایط نامساعد محیطی ایفا می‌کنند. این عناصر شرایط عمومی گیاه

را بهبود بخشیده و به‌عنوان کاتالیزور در واکنش‌های بیوشیمیایی در گیاهان شرکت می‌کنند (Nasiri et al., 2013). از جمله عناصر ریزمغذی ضروری برای گیاه، آهن می‌باشد. با وجود اینکه این عنصر به مقدار کم مورد نیاز گیاهان می‌باشد، ولی نقش اساسی در ساختمان کلروپلاست و رشد و نمو گیاهان دارد. عنصر آهن به‌همراه روی به‌عنوان کوفاکتور آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، موجب افزایش فعالیت این آنزیم‌ها شده و نقش مهمی در تعدیل رادیکال‌های آزاد و آثار تخریبی آن‌ها در سیستم‌های غشایی دارند و در نتیجه تحمل گیاهان به تنش را از طریق بسیاری از فرایندهای متابولیکی و تغییر بیان ژن‌های درگیر افزایش می‌دهند (Narimani et al., 2018; Raeesi et al., 2021). عنصر آهن در خاک به‌صورت یون Fe^{++} در کانی‌هایی مثل هماتیت و پیریت وجود دارد که کمبود آن در خاک باعث عدم تولید کلروفیل و رنگ‌پریدگی گیاه می‌شود که این علائم در اغلب خاک‌های ایران مشهود است (Pirzad et al., 2013). تنش آهن در گیاهان با ایجاد انواع اکسیژن‌های فعال همراه است که به‌نوبه خود تنش اکسیداتیو را در گیاه القا می‌کند (Tiryakioglu et al., 2006). گونه‌های فعال اکسیژن در شرایط معمول به مقدار کم در اندامک‌هایی مانند کلروپلاست، میتوکندری و پراکسی زوم تولید می‌شوند ولی تغییرات در شرایط محیطی، باعث افزایش تولید ROS در اندامک‌هایی مانند کلروپلاست و میتوکندری می‌شود (Dinakar et al., 2008; Phua et al., 2021). در این شرایط، فرایندهای سم‌زدایی به‌صورت ناقص صورت گرفته و عدم خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد و افزایش پراکسید هیدروژن در گیاه منجر به افزایش واکنش‌های فنتون و هابروایس شده که طی آن‌ها رادیکال خطرناک هیدروکسیل تولید و می‌تواند به‌صورت پی‌درپی انواع ماکرومولکول‌های زیستی، از جمله لیپیدها و پروتئین‌ها را ناپایدار سازند (Tiryakioglu et al., 2006). بروز پاسخ‌های گیاه جهت سازش با شرایط جدید همراه با تغییر الگوی بیانی برخی از ژن‌های عملکردی و تنظیمی می‌باشد (Fahmideh et al., 2020) و برای کاهش اثرات مخرب

کدکننده آنزیم‌های فوق در گندم نان مطالعه نشده است، این پژوهش به منظور مطالعه بیان ژن‌های کدکننده آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان ژن‌های کاتالاز (CAT)، آسکوربات‌پراکسیداز (ASC) و پلی‌فنل‌اکسیداز (PPO) در پاسخ به کمبود آهن در ریشه و برگ در ارقام آهن-کارا و آهن-ناکارای گندم نان طراحی شد.

مواد و روش‌ها

تهیه خاک و کشت مواد گیاهی: این تحقیق در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه در سال ۱۳۹۹ به صورت فاکتوریل با سه فاکتور (رقم، بافت گیاهی و مرحله نمونه برداری هر کدام در ۲ سطح) در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار اجرا گردید. خاک مورد استفاده از اطراف ارومیه تهیه و پس از انجام آزمایش و اطمینان از کمبود آهن، در گلدان‌های پلی‌اتیلن به قطر ۱۱ و ارتفاع ۳۴ سانتی‌متر، ۳ کیلوگرم خاک ریخته و تیمار آهن بر اساس حد بحرانی آهن در خاک در دو سطح کمبود آهن (کمتر از ۱/۵ میلی‌گرم آهن در کیلوگرم خاک) و شاهد (۱۰ میلی‌گرم آهن در کیلوگرم خاک) اعمال شد (Malakuti and Tehrani, 2005; Mirparizi *et al.*, 2022). مقدار اولیه آهن خاک، ۱/۴ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک (تیمار کمبود آهن) بود که با کود سکوسترین (Fe-EDDHA) مقدار آن به ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک در تیمار کفایت آهن رسانده شد. محلول غذایی برای هر دو تیمار به طور یکسان اعمال شد با این تفاوت که محلول غذایی تیمار کمبود آهن فاقد کود سکوسترین بود (جدول ۱). بعد از آماده‌سازی خاک، بذور ارقام پیش‌تاز (آهن-کارا) و فلات (آهن-ناکارا)، در عمق ۲ سانتی‌متر زیر خاک کشت گردید. در طول دوره داشت، آبیاری طوری انجام شد که رطوبت خاک در حد ظرفیت زراعی باشد. به منظور مطالعه بیان ژن، نمونه‌ها در ۲ مرحله رشدی؛ یک ماه بعد از جوانه‌زنی (رویشی) و ۳۰ درصد سنبله‌دهی (زایشی) از ریشه و برگ گیاهان برداشت و در داخل ازت مایع فریز و به فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد انتقال داده شد. استخراج RNA و سنتز cDNA: استخراج RNA از نمونه‌های ریشه و برگ به کمک محلول استخراج RNX-

رادیکال‌های آزاد اکسیژن، گیاهان سازوکارهای مختلفی از جمله تولید ترکیبات آنتی‌اکسیدان آنزیمی و غیرآنزیمی دارد. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گیاهان از قبیل کاتالاز، پراکسیداز، سوپراکسیددیسموتاز و پلی‌فنل‌اکسیداز در شرایط تنش فعال شده و باعث تجزیه گونه‌های فعال اکسیژن می‌شوند (Rajput *et al.*, 2016). افزایش تولید آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مختلف و بیان ژن‌های کدکننده آن‌ها در پاسخ به کمبود عناصر ریزمغذی مختلف در بسیاری از مطالعات گزارش شده است. در پژوهشی که به منظور بررسی اثر تنش کمبود عنصر روی بر بیان ژن‌های کدکننده آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز، آسکوربات‌پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز در ارقام روی-کارا و روی-ناکارا گندم نان انجام شد، بیشترین میزان افزایش بیان ژن کاتالاز (۵/۷۴ برابر کنترل) در شرایط کمبود روی در مرحله زایشی در ارقام روی-کارا مشاهده شد. همچنین میزان بیان این ژن و ژن کدکننده آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز در تنش کمبود روی در برگ ارقام روی-کارا بیشتر از برگ ارقام روی-ناکارا بود. بیشترین افزایش بیان ژن کدکننده آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز (۵/۶۲ برابر کنترل) نیز در شرایط کمبود روی در برگ رقم روی-کارا مشاهده شد (Rahimi Jarhani and Abdollahi Mandoulakani, 2019). مطالعه اثر کمبود روی خاک بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گندم نان، فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات‌پراکسیداز در تنش کمبود روی در ارقام روی-کارا بیشتر از ارقام روی-ناکارا بود (Niazkhani *et al.*, 2018). شی و همکاران (Shi *et al.*, 2013) بیان کردند که در ریشه و برگ گیاهچه‌های گندم، میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز و آسکوربات‌پراکسیداز در غلظت زیاد عنصر روی افزایش می‌یابد. آگاروال و همکاران (Agarwal *et al.*, 2006) گزارش کردند که کمبود آهن و مس در گندم منجر به از بین رفتن سطح برگ و زیست‌توده کل می‌شود. همچنین فعالیت سوپراکسیددیسموتاز، آسکوربات‌پراکسیداز و کاتالاز در گیاهان در اثر کمبود مس و آهن کاهش یافت. با توجه به این‌که تاکنون اثر تنش کمبود آهن بر بیان ژن‌های

واکنش‌های Real-time PCR در حجم ۱۲/۵ میکرولیتر بر اساس شیوه‌نامه کیت SYBER Green/Fluorescence qPCR Master Mix (2x) (ThermoFisher Scientific، آمریکا) انجام شد. الگوی دمایی به‌منظور تکثیر ژن‌های مورد نظر با توجه به اندازه محصول حاصل از تکثیر و توالی آغازگر و همچنین بر اساس شیوه‌نامه کیت فوق تعیین گردید. سپس به‌منظور اطمینان از صحت تکثیر محصول هر ژن، منحنی ذوب هر کدام از ژن‌ها با افزایش دما از ۶۰ درجه سانتی‌گراد تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد (در هر ثانیه ۰/۵ درجه) رسم و صحت تکثیر هر ژن مورد بررسی قرار گرفت. همچنین صحت تکثیر با استفاده از ژل-الکتروفورز نیز تأیید گردید. جهت نرمال‌سازی داده‌ها از ژن اکتین به‌عنوان ژن مرجع استفاده شد (Wang et al., 2019). برای محاسبه بیان نسبی ژن‌ها، ابتدا مقادیر سیکل آستانه (Cycle of threshold: Ct) با استفاده از نرم‌افزار Rotor-Gene Q استخراج و بیان نسبی ژن‌ها در گیاهان تیمار شده نسبت به گیاهان شاهد با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد. نرمال بودن توزیع اشتباهات و داده‌های بیان ژن با روش کلموگراف-اسمیرنوف در نرم‌افزار MINITAB نسخه ۱۹ بررسی و در نهایت تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون SNK در نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۲ انجام گرفت.

plus™ (سیناکلون، ایران) بر اساس شیوه‌نامه پیشنهادی شرکت سازنده انجام شد. کمیت و کیفیت RNA با استفاده از نانودراپ و ژل (یک درصد)-الکتروفورز تعیین شد. به‌منظور سنتز cDNA از کیت RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis (ThermoFisher Scientific، آمریکا) بر اساس شیوه‌نامه پیشنهادی شرکت سازنده استفاده شد. به‌منظور حذف آلودگی DNA ژنومی، تیمار DNase (بر اساس شیوه‌نامه شرکت سازنده کیت سنتز cDNA) استفاده شد. همچنین جهت اطمینان از عدم وجود آلودگی DNA ژنومی و صحت سنتز cDNA، واکنش‌های کنترل RT- (عدم استفاده از آنزیم Reverse transcriptase در مرحله سنتز)، NTC (عدم استفاده از RNA در مرحله سنتز) و واکنش‌های کنترل مثبت (سنتز cDNA با استفاده از RNA و ژن Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) موش موجود در کیت) انجام شد.

واکنش‌های Real-time PCR: میزان بیان ژن‌های آسکوربات‌پراکسیداز، کاتالاز و پلی‌فنل‌اکسیداز با استفاده از دستگاه Rotor gene Q-Pure Detection-Qiagen مدل ۶۰۰۰ (Qiagen، آمریکا) با استفاده از آغازگرها اختصاصی (جدول ۲) در گیاهان تیمار شده نسبت به شرایط نرمال اندازه‌گیری شد.

جدول ۱- ترکیب محلول غذایی مورد استفاده در آزمایش

Table 1. The composition nutrient solution used in the experiment

عناصر Elements	مقدار (میلی‌گرم) Amount (mg)	کود Fertilizer	غلظت (میلی‌گرم/کیلوگرم) Concentration (mg/kg)
N	30	CH ₄ N ₂ O	65.22
P	50	Ca(PO ₄ H ₂) ₂	249
K	100	K ₂ SO ₄	223
Zn	5	ZnSO ₄	22.1
Cu	5	CuSO ₄	19.6
Fe	10	Fe-EDDHA	182

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در واکنش‌های Real-time PCR

Table 2. Characteristics of the primers used for Real-time PCR reactions

ژن Gene	شماره دسترسی Accession number	توالی آغازگرها Primer sequence (5' - 3')	دمای اتصال (سانتی‌گراد) Annealing temperature (°C)	طول محصول (جفت‌باز) Amplicon length (bp)
<i>Actin3</i>	TC234027	F: GACGCACAACAGGTATCGTGTG R: CAGCGAGGTCAAGACGAAGGATG	60	107
<i>CAT</i>	GU984379	F: TGATGGGAGTCTGTGCTTGTG R: TGCTCCACATCGGGGCGTTGAA	62	107
<i>ASC</i>	AY513262	F: TGAGTCATGGAGCGAATGCTGGTC R: TGCTGTAGCACTCGCCAACTGGAA	64	116
<i>PPO</i>	AY515506	F: CGATCTACGCCAACAGGTCGTC R: CACTGGAGTCAAGGTCGGTCAGCA	64	90

نتایج و بحث

یکی از سه ایزوفرم کاتالاز) تحت شرایط شدید کمبود آهن، فعالیت H_2O_2 در ریشه‌ها به میزان زیادی افزایش می‌یابد (Von der Mark *et al.*, 2021)؛ بنابراین در مطالعه حاضر افزایش بیان نسبی ژن کاتالاز در ریشه در مرحله زایشی احتمالاً ناشی از فعالیت آنزیم کاتالاز برای حذف گونه‌های فعال اکسیژن تولید شده در اثر تنش می‌باشد. همچنین بر اساس مطالعه‌ای که به منظور بررسی تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در گیاهان جوان ذرت تحت شرایط کمبود آهن انجام گرفت، مشخص شد که فعالیت کاتالاز تحت شرایط شدید کمبود آهن، ۷۰-۲۰ درصد کاهش می‌یابد، اما با گذشت ۲۸ روز از دوره رویشی بازیابی فعالیت طبیعی این آنزیم مشاهده شد؛ بنابراین این ایده سازگاری جزئی گیاهان نسبتاً کلروتیک با شرایط کمبود آهن را پشتیبانی می‌کند (Nenova and Stoyano, 1995). در گیاه نخودفرنگی، فعالیت کاتالاز در شرایط کمبود آهن بدون توجه به درجه کلروز گیاه، تغییر نکرد ولی در اواخر دوره رشد رویشی فعالیت دو برابری آنزیم کاتالاز در برگ گزارش شد (Kaur *et al.*, 1984). در مطالعه حاضر نیز بیان ژن کاتالاز در مرحله زایشی در ریشه هر دو رقم به طور قابل توجهی افزایش یافت.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۳) نشان داد که اثر متقابل سه‌جانبه رقم \times بافت \times مرحله نمونه‌برداری برای بیان ژن‌های کدکننده آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود ولی این اثر برای ژن پلی فنول اکسیداز معنی‌دار نبود. با این حال اثر متقابل دوجانبه بافت \times مرحله نمونه‌برداری بر بیان این ژن معنی‌دار بود؛ بنابراین مقایسه میانگین تیمارها بر اساس اثرات متقابل معنی‌دار به روش SNK انجام گرفت. **بیان ژن کاتالاز:** میزان بیان نسبی ژن کاتالاز در مرحله زایشی هر دو رقم به طور قابل توجهی در بافت ریشه افزایش ولی در برگ کاهش یافت. بیشترین میزان افزایش بیان این ژن در ریشه رقم آهن-کارا (پیش‌تاز) در مرحله زایشی مشاهده شد. همچنین میزان بیان این ژن در مرحله رویشی در ریشه هر دو رقم کاهش ولی در برگ رقم کارا در همین مرحله افزایش و در رقم ناکارا تغییری نکرد (شکل ۲-الف). در تحقیقی که در گیاه آراییدوپسیس در شرایط مقادیر مختلف آهن به منظور بررسی میزان فعالیت گونه‌های فعال اکسیژن انجام گرفت مشاهده شد که با سرکوب ژن *CAT2*

جدول ۳- تجزیه واریانس بیان نسبی ژن‌های کاتالاز (*CAT*)، آسکوربات پراکسیداز (*ASC*) و پلی فنل اکسیداز (*PPO*) در ریشه و برگ ارقام آهن-کارا و آهن-ناکارا گندم نان در مراحل رویشی و زایشی

Table 3. Analysis of variance for relative expression of catalase (*CAT*), ascorbate peroxidase (*ASP*) and polyphenol oxidase (*PPO*) genes in root and leaf of bread wheat cultivars in vegetative and reproductive stages

منابع تغییرات Source of variations	درجه آزادی Degree of freedom	میانگین مربعات Mean squares		
		CAT	ASC	PPO
رقم Cultivar (C)	1	4.182**	0.039 ^{ns}	0.403 ^{ns}
بافت Tissue (T)	1	35.05**	18.21**	6.65**
مرحله نمونه‌برداری Sampling stage (S)	1	21.30**	4.34**	18.53**
C \times T	1	0.024 ^{ns}	6.34**	0.034 ^{ns}
C \times S	1	0.023 ^{ns}	25.13**	0.212 ^{ns}
T \times S	1	72.34**	32.86**	4.68**
C \times T \times S	1	3.92**	6.26**	0.023 ^{ns}
خطا Error	16	0.289	0.260	0.106
ضریب تغییرات (درصد) Coefficient of variation (%)		20.87	24.19	25.10

^{ns} و **: به ترتیب غیرمعنی‌داری و معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد

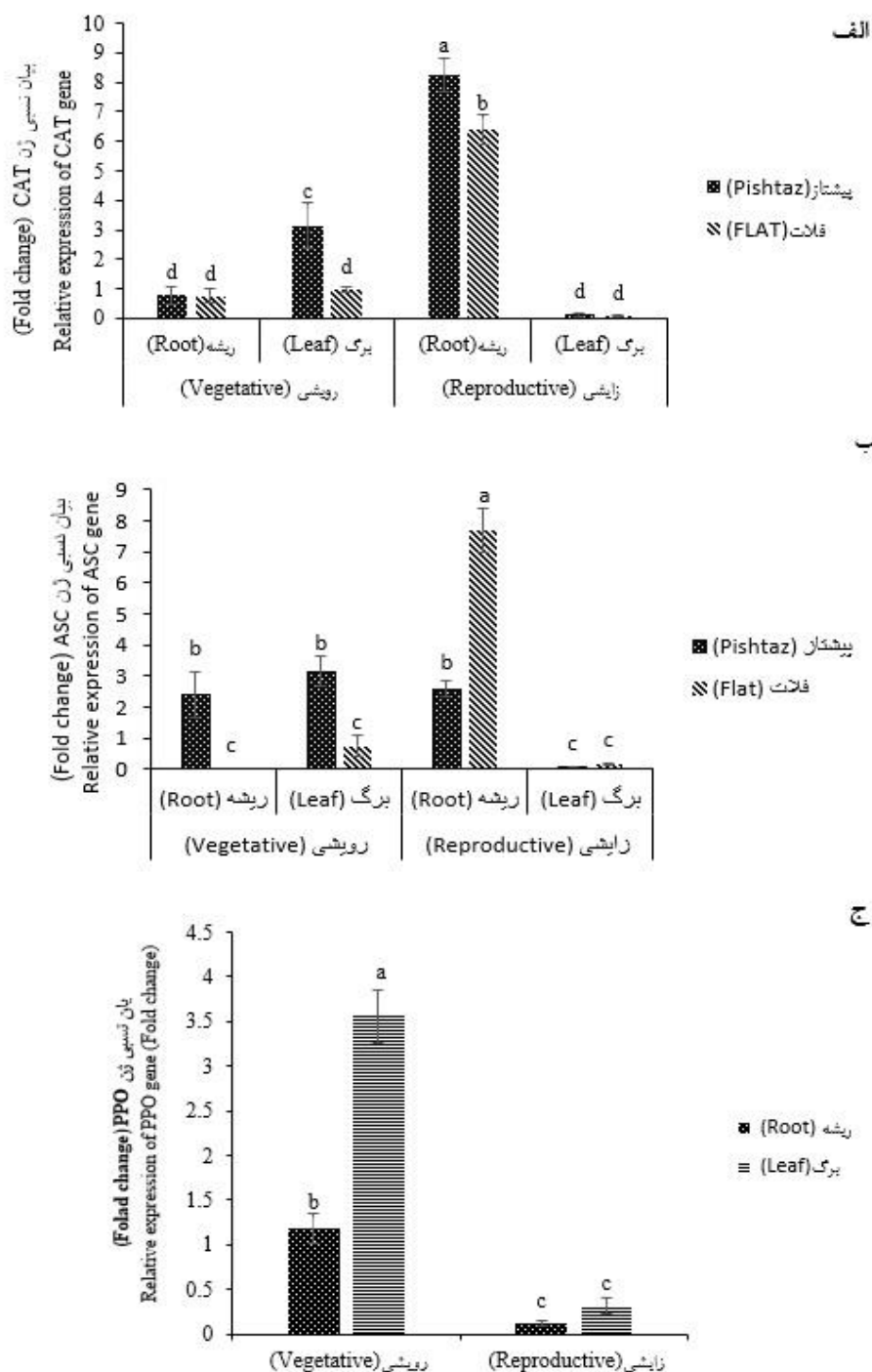
^{ns} and **: Non-significant and significant at 1% probability level, respectively.

انتقال آن به اندام‌های هوایی و در نتیجه عدم دسترسی آنزیم آسکوربات پراکسیداز به عنصر آهن در برگ می‌باشد (Gogorcena et al., 2005). افزایش بیان ژن آسکوربات پراکسیداز در مرحله رویشی در ریشه و برگ رقم آهن-کارا نسبت به آهن-ناکارا، احتمالاً ناشی از کارایی رقم پیش‌تاز در جذب آهن در شرایط کمبود آهن و در دسترس قرار دادن این عنصر در اختیار آنزیم آسکوربات پراکسیداز باشد. یک روش مقرون به صرفه، کارآمد و پرکاربرد برای جلوگیری از کمبود آهن در گیاهان، به‌کارگیری ژنوتیپ‌های متحمل به کمبود آهن می‌باشد (Molassiotis et al., 2006). برخی از گیاهان با وجود استفاده از سازوکارهای جذب آهن توسط ریشه، حساسیت زیادی به کمبود آهن نشان می‌دهد که این به دلیل غیرفعال شدن آهن در آپوپلاست ریشه و عدم انتقال آن به اندام هوایی است (Assimakopoulou et al., 2011).

بیان ژن پلی فنل اکسیداز: مطابق با نتایج مقایسه میانگین، میزان بیان این ژن در برگ در مرحله رویشی در شرایط کمبود آهن، ۳/۵ برابر کنترل افزایش یافت در حالی که مقدار افزایش آن در ریشه در همین مرحله ناچیز (۱/۱۸) بود. همچنین بیان این ژن در مرحله زایشی در هر دو بافت برگ و ریشه نسبت به کنترل کاهش معنی‌داری نشان داد (شکل ۲-ج).

پلی فنل اکسیداز از آنزیم‌های تنظیم‌کننده لیگنین است که در چرخه آنتی اکسیدانی نقش دارد. این آنزیم‌ها عمدتاً کوماریل، کینفریل و سیناپیل را کاتالیز می‌کنند (Boudet, 2000). پلی فنل اکسیداز در بیشتر گیاهان عالی یافت می‌شود و کار اصلی آن کاتالیز کردن نوعی کوئینون از فنل هاست. شرایط رشدی مانند بروز تنش و نوع ژنوتیپ بر فعالیت این آنزیم تأثیرگذار می‌باشد. افزایش میزان نسبی بیان این ژن در مرحله رویشی در برگ می‌تواند به دلیل افزایش میزان فنل در شرایط تکمیل رشد گیاه تحت شرایط تنشی باشد که می‌تواند گیاه را از آسیب‌های ناشی از تنش محافظت کند. در بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی در برگ و ریشه برنج در اثر کمبود آهن نیز گزارش شده است که میزان فعالیت آنزیم پلی فنل-اکسیداز با کاهش میزان آهن در خاک در بخش هوایی افزایش می‌یابد (Gupta et al., 2011).

بیان ژن آسکوربات پراکسیداز: میزان بیان این ژن در مرحله رویشی در ریشه و برگ رقم کارا به طور معنی‌داری افزایش ولی در رقم ناکارا کاهش یافت. در مرحله زایشی، میزان بیان این ژن در ریشه رقم ناکارا بیشتر از رقم کارا افزایش یافت ولی بیان این ژن در برگ هر دو رقم کاهش یافت (شکل ۲-ب). در کلروپلاست، فردوکسین ممکن است به جای NADP الکترون خود را به اکسیژن مولکولی داده، رادیکال آزاد اکسیژن تولید کند و یا پراکسید هیدروژن ممکن است در تنفس نوری با فعالیت سوپراکسید دیسموتاز ایجاد شود. هرچند در شرایط عادی، سوپراکسید دیسموتاز رادیکال آزاد را از بین می‌برد و کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز به سادگی پراکسید هیدروژن را تجزیه می‌کنند، اما در شرایط تنش مانند کمبود آهن، فرآیند سم‌زدایی به طور ناقص انجام می‌شود. آسکوربات پراکسیداز از آنزیم‌های کلروپلاستی است که در تجزیه پراکسید هیدروژن کلروپلاستی شرکت دارد. در نتیجه کاهش فعالیت این آنزیم میزان پراکسید هیدروژن در کلروپلاست افزایش می‌یابد و میزان کلروفیل و کاروتنوئیدها در گیاه کاهش یافته که خود منجر به کاهش میزان فتوسنتز می‌شود. با توجه به این که آهن در بیوسنتز کلروفیل دخالت دارد، کمبود آهن به طور مستقیم نیز به کاهش میزان کلروفیل در گیاه منجر می‌شود (Kiani et al., 2013). افزایش بیان ژن آسکوربات پراکسیداز در ریشه در مرحله زایشی در هر دو رقم و در برگ و ریشه رقم آهن-کارا در مرحله رویشی می‌تواند به خاطر نقش این آنزیم در سم‌زدایی گونه‌های فعال اکسیژن در شرایط تنش کمبود آهن باشد. در درختان هلو و بادام تلخ در شرایط کمبود آهن گزارش شده که احتمالاً افزایش اسیدپتیک آپوپلاست، موجب به دام افتادن مقدار زیادی از آهن در آپوپلاست سلول‌های ریشه شده و بنابراین انتقال آهن به سمت سلول‌های آوندی ریشه محدود می‌شود. گیاهان دچار کلروز برگ، اغلب آهن فراوانی در ریشه‌های خود دارند و کلروز در آنها ممکن است مربوط به عدم تحرک کافی آهن در ریشه و انتقال آن به اندام هوایی باشد. کاهش بیان نسبی ژن آسکوربات پراکسیداز در برگ هر دو رقم در مرحله زایشی در مطالعه حاضر احتمالاً ناشی از تجمع آهن در ریشه و عدم



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل رقم × بافت × مرحله نمونه‌برداری بر بیان نسبی ژن کاتالاز (CAT) (الف)، آسکوربات پراکسیداز (ASC) (ب) و مقایسه میانگین اثر متقابل بافت × مرحله نمونه‌برداری بر بیان نسبی ژن پلی‌فنل اکسیداز (PPO) (ج) در دو رقم آهن‌کارا (پیش‌تاز) و آهن‌ناکارا (فلات) گندم نان. ستون‌های (± خطای معیار) دارای حروف مشترک، اختلاف معنی‌داری بر اساس آزمون SNK در سطح احتمال یک درصد ندارند.

Figure 2. Mean comparison for interaction effect of cultivar × tissue × sampling stage on the relative expression of catalaz (CAT)(A), ascorbate peroxidase (ASC) (B) and mean comparison for interaction effect of tissue × sampling stage on the relative expression of polyphenol oxidase (PPO)(C) gene in Fe efficient (Pishtaz) and Fe inefficient (Falat) bread wheat cultivars. Columns (± standard error) with the similar letters on each graph show no significant difference by SNK test at 1% probability level.

در هر دو رقم داشت. در همین مرحله میزان بیان ژن پلی‌فنل‌اکسیداز در ریشه نیز ۱/۱۸ برابر کنترل افزایش یافت. بیشترین میزان افزایش بیان ژن آسکوربات‌پراکسیداز در شرایط کمبود آهن در ریشه رقم فلات در مرحله زایشی مشاهده شد. البته میزان بیان این ژن در همین مرحله در ریشه رقم پیشتاز نیز بیش از ۲/۵ برابر کنترل افزایش یافت.

به‌طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که در شرایط کمبود آهن میزان بیان نسبی ژن کاتالاز تحت شرایط کمبود آهن در ریشه هر دو رقم آهن-کارا (پیشتاز) و آهن-ناکارا (فلات) به‌طور قابل‌توجهی افزایش می‌یابد که این افزایش در رقم پیشتاز به‌طور معنی‌داری بیشتر از رقم فلات بود. میزان بیان ژن پلی‌فنل‌اکسیداز در مرحله رویشی در برگ افزایش چشم‌گیری

References

- Abdoli, M. and Esfandiari, E.** (2014). Effect of zinc foliar application on the quantitative and qualitative yield and seedlings growth characteristics of bread wheat (cv. Kohdasht). *Iranian Journal of Dryland Agriculture*, **3**: 77-90 (In Persian).
- Agarwal, S., Sairam, R.K., Meena, R.C., Tyagi, A. and Srivastava, G.C.** (2006). Effect of excess and deficient levels of iron and copper on oxidative stress and antioxidant enzymes activity in wheat. *Plant Science*, **1**: 86-97.
- Assimakopoulou, A., Holevas, C.D. and Fasseas, K.** (2011). Relative susceptibility of some Prunus rootstocks in hydroponics to iron deficiency. *Journal of Plant Nutrition*, **34**: 1014-1033.
- Boudet, A.M.** (2000). Lignins and lignification: selected issues. *Plant Physiology and Biochemistry*, **38**: 81-96.
- Dinakar, N., Nagajyothi, P.C., Suresh, S., Udaykiran, Y. and Damodharam, T.** (2008). Phytotoxicity of cadmium on protein, proline and antioxidant enzyme activities in growing *Arachis hypogaea* seedlings. *Journal of Environmental Sciences*, **20**: 199-206.
- Fahmideh, L., Delarampoor, M.A. and Fooladvand, Z.** (2020). Study of MYB transcription factor gene expression in some bread wheat cultivars of Sistan region, Iran. *Plant Genetic Researches*, **7**(1): 181-196 (In Persian).
- FAO.** (2019). FAOSTAT. Food and Agricultural Organization of the United Nations. Available at <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (accessed on 9 September 2019). FAO. Rome, Italy.
- Gogorcena, Y., Abadía, J. and Abadía, A.** (2005). A new technique for screening iron-efficient genotypes in peach rootstocks: elicitation of root ferric chelate reductase by manipulation of external iron concentrations. *Journal of Plant Nutrition*, **27**: 1701-1715.
- 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.
- Hao, C., Wang, Y., Chao, S., Li, T., Liu, H., Wang, L. and Zhang, X.** (2017). The iSelect 9 K SNP analysis revealed polyploidization induced revolutionary changes and intense human selection causing strong haplotype blocks in wheat. *Scientific Reports*, **7**(1): 41247.
- 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).
- Hossain, A., da Silva, J.A.T., Lozovskaya, M.V., Zvolinsky, V.P. and Mukhortov, V.I.** (2012). High temperature combined with drought affect rainfed spring wheat and barley in South-Eastern Russia: I. Phenology and growth. *Saudi Journal of Biological Sciences*, **4**: 184-196.
- Kaur, N.P., Takkar, P.N. and Nayyar, V.K.** (1984). Catalase, peroxidase, and chlorophyll relationships to yield and iron deficiency chlorosis in Cicer genotypes. *Journal of Plant Nutrition*, **7**: 1213-1220.
- Kiani Chalmardi, Z., Abdolzadeh, A. and Sadeghipour, H.R.** (2013). Evaluation of the effects of silicon nutrition on alleviation of iron deficiency in rice plants (*Oryza sativa* L.) with emphasis on growth and antioxidant enzymes activity. *Iranian Journal of Plant Biology*, **4**: 61-74 (In Persian).
- Malakuti, M.J. and Tehrani, M.M.** (2005). *The Role of Micronutrients in Increasing the Yield and Improving the Quality of Macronutrient Microelements Products*. Publications of Tarbiat Modares University, Tehran, IR (In Persian).

- Mirparizi, E., Barani Motlagh, M., Movahedi Naeini, S.A., Ghorbani Nasrabadi, R., and Bakhtiary, S.** (2022). Effects of copper slag and organic matters on physiological indices of iron deficiency in sorghum (*Sorghum bicolor*). *Journal of Water and Soil*, **35(6)**: 823-841 (In Persian).
- Molassiotis, A., Tanou, G., Diamantidis, G., Patakas, A. and Therios, I.** (2006). Effects of 4-month Fe deficiency exposure on Fe reduction mechanism, photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and antioxidant defense in two peach rootstocks differing in Fe deficiency tolerance. *Journal of Plant Physiology*, **163**: 176-185.
- Munns, R. and Tester, M.** (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual review of Plant Biology*, **59**: 651-681.
- Narimani, H., Seyed Sharifi, R., Khalilzadeh, R. and Aminzadeh, G.** (2018). Effects of nano iron oxide on yield, chlorophyll fluorescence indices and some physiological traits of wheat (*Triticum aestivum* L.) under rain fed and supplementary irrigation conditions. *Iranian Journal of Plant Biology*, **10(3)**: 21-40 (In Persian).
- Nasiri, Y., Zehtab Salmasi, S., Nasrullah Zadeh, S., Ghassemi Gholezani, K., Najafi, N. and Javanmard, A.** (2013). Evaluation of foliar spray of ferrous sulfate and zinc sulfate on yield and nutrients concentration of aerial parts in German chamomile. *Journal of Agricultural Science and Sustainable Production*, **23**: 105-115 (In Persian).
- Nenova, V. and Stoyano, I.** (1995). Physiological and biochemical changes in young maize plants under iron deficiency: 2. Catalase, peroxidase, and nitrate reductase activities in leaves. *Journal of Plant Nutrition*, **18**: 2081-2091.
- Niazkhani, S.M., Abdollahi Mandoulakani, B., Jafari, M. and Rasouli-Sadaghiani, M.H.** (2018). Effect of soil zinc deficiency on antioxidant enzymes activity and some biochemical parameters in bread wheat. *Scientific Journal of Crop Physiology*, **11**: 5-27 (In Persian).
- Phua, S.Y., De Smet, B., Remacle, C., Chan, K.X. and Van Breusegem, F.** (2021). Reactive oxygen species and organellar signaling. *Journal of Experimental Botany*, **72(16)**: 5807-5824.
- Pirzad, A.R., Tousi, P. and Darvishzadeh, R.** (2013). Effect of Fe and Zn foliar application on plant characteristics and essential oil content of anise (*Pimpinella anisum* L.). *Iranian Journal of Crop Sciences*. **15**: 12-23 (In Persian).
- Raeesi Sadati, S.Y., Jahanbakhsh Godehkahriz, S., Ebadi, A. and Sedghi, M.** (2021). Study of expression pattern of some transcription factors in wheat under drought stress and zinc nanoparticles. *Plant Genetic Researches*, **7(2)**: 135-144 (In Persian).
- Rahimi Jarihani, L. and Abdollahi Mandoulakani, B.** (2019). Expression pattern of genes encoding catalase, ascorbate peroxidase and polyphenol oxidase enzymes under conditions of soil zinc deficiency in bread wheat. *Journal of Cell and Molecular Research*, **34**: 1-12 (In Persian).
- Rajput, V., Minkina, T., Yaning, C., Sushkova, S., Chaplgin, V. and Mandzhieva, S.** (2016). A review on salinity adaptation mechanism and characteristics of *Populus euphratica*, a boon for arid ecosystems. *Acta Ecologica Sinica*, **36**: 497-503.
- Reddy, K.R. and Hodges, H.F.** (2000). *Climate Change and Global Crop Productivity*. CABI, Wallingford, UK.
- Shi, X., Su-nan, X., Yue, L. and Zhong-lin, C.H.** (2013). Impacts of zinc, benzo [a] pyrene, and their combination on the growth and antioxidant enzymes activities of wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Journal of Ecology*, **32**: 358-362.
- Tiryakioglu, M., Eker, S., Ozkutlu, F., Husted, S. and Cakmak, I.** (2006). Antioxidant defense system and cadmium uptake in barley genotypes differing in cadmium tolerance. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, **20**: 181-189.
- Von der Mark, C., Ivanov, R., Eutebach, M., Maurino, V.G., Bauer, P. and Brumbarova, T.** (2021). Reactive oxygen species coordinate the transcriptional responses to iron availability in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, **72**: 2181-2195.
- Wang, M., Kawakami, Y. and Bhullar, N.K.** (2019). Molecular analysis of iron deficiency response in hexaploid wheat. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, **3**: 67.
- Wani, S.H. and Sah, S.K.** (2014). Biotechnology and abiotic stress tolerance in rice. *Journal of Rice Research*, **2(2)**: e105.

Winfield, M.O., Allen, A.M., Wilkinson, P.A., Burridge, A.J., Barker, G.L., Coghill, J., Waterfall, C., Wingen, L.U., Griffiths, S. and Edwards, K.J. (2018). High-density genotyping of the AE Watkins Collection of hexaploid landraces identifies a large molecular diversity compared to elite bread wheat. *Plant Biotechnology Journal*, **16(1)**: 165-175.