

## The Effect of Iron Deficiency on the Expression of Genes Encoding Transcription Factors *bZIP4*, *bZIP79*, and *bZIP97* in Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.)

Fatemeh Asadzadeh<sup>1</sup>  and Babak Abdollahi Mandoulakani<sup>2,\*</sup> 

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

\*Corresponding author ✉: [b.abdollahi@urmia.ac.ir](mailto:b.abdollahi@urmia.ac.ir)

**Citation:** Asadzadeh, F. and Abdollahi Mandoulakani, B. (2024). The Effect of iron deficiency on the expression of genes encoding transcription factors *bzip4*, *bzip79*, and *bzip97* in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Genetic Researches*, 11(1): 1-14. <http://dx.doi.org/10.22034/PGR.11.1.1>

(Received: October 24, 2023; Final Revised: May 1, 2024; Accepted: May 8, 2024; Published online: September 21, 2024)

### Extended abstract

#### Introduction

Biotic and abiotic environmental stresses are the main factors in reducing wheat production and yield. The deficiency of micronutrients is one of the environmental stresses that are considered a serious threat to agricultural production. In developing countries, human malnutrition is caused by micronutrient deficiencies in staple foods such as rice and wheat in Asia and corn and sorghum in Africa. Micronutrients are elements that plants need in very small amounts to complete their life cycle. Iron, as one of these micronutrients, plays an effective role in the growth of plant cells, respiration, development of different cells related to photosynthesis, biosynthesis of hormones, and the processes of plant metabolism. Iron plays a very important role in the production of chlorophyll, the production of carbohydrates, the chemical reduction of nitrate and sulfate, respiration, and the conversion of nitrate nitrogen into amino acids. Also, the main reason for the pale color of plants is due to iron deficiency, which has been observed in most of the soils in Iran. Cultivation of element-efficient cultivars is one of the strategies to compensate for micronutrient deficiencies as one of the main problems of agriculture. Due to the activity of genes and proteins involved in iron absorption, the iron-efficient cultivars are highly efficient in absorbing iron from the soil and transporting it inside the plant. Also, these plants do not show symptoms related to iron deficiency. Transcription factors are proteins that specifically bind to the activators around the gene and play an important role in regulating the life processes of a plant. bZIP family are among the most important transcription factors that are involved in the activation of genes responsible for the absorption and transport of iron in plants.

#### Materials and methods

To study the expression pattern of genes encoding *bZIP4*, *bZIP79*, and *bZIP97* transcription factors under iron deficiency conditions in bread wheat, a factorial experiment was conducted in the form of a completely randomized design with three replications in the research greenhouse of Urmia University. Pishtaz (iron-efficient) and Falat (iron-inefficient) cultivars were grown under conditions of iron deficiency and iron sufficiency (less than 1.4 and 10 mg of iron per kilogram of soil, respectively). The leaves and roots of the plants were harvested in two vegetative (one month after germination) and reproductive (30% spike yield) stages. Then, RNA was extracted from the root and leaf samples and cDNA was synthesized. The relative expression of the genes encoding the aforementioned transcription factors was measured under iron deficiency conditions compared to iron sufficiency



©2024 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.

conditions by considering 3 biological and 3 technical replicates using real time PCR. In this process, the actin gene was used as a reference gene to normalize the data. After performing the real time PCR reaction, the melting curves were drawn for each gene by increasing the temperature from 45 °C to 95 °C per second at 0.5 °C, and the accuracy and specificity of the products of each gene were determined using the melting curve analysis and gel electrophoresis analysis.

## Results and discussion

The results of ANOVA of the data showed that the interaction effects of cultivar × tissue × sampling stage on the expression of all three genes were significant. Based on the results of the comparison of the mean for three-way interaction by the SNK method, the relative expression of the genes encoding *bZIP79* and *bZIP97* was considerably increased, respectively, in the leaves of the iron-efficient cultivar (Pishtaz) and the iron-inefficient cultivar (Flat) in the vegetative stage. The highest relative expression of the *bZIP4* transcription factor was observed in the roots of the Pishtaz cultivar at the vegetative stage. Also, the expression level of the *bZIP97* gene in the leaves of the iron-inefficient cultivar increased in the vegetative stage but decreased in the Pishtaz cultivar.

## Conclusion

Considering the enhancement in the relative expression of the *bZIP4* gene in the roots of the iron-efficient (Pishtaz) cultivar in the vegetative stage, this gene is probably involved in the activation and induction of the expression of genes responsible for the absorption of iron from the soil in the roots of bread wheat. Also, the increase in the relative expression of the *bZIP79* gene in the leaves of the iron-efficient cultivar at the vegetative stage indicates that this gene probably participates in the transcriptional activation of genes involved in the transfer of iron from leaves to seeds and other iron-consuming tissues under iron deficiency conditions. The expression of the *bZIP97* gene in the leaves of the iron-inefficient cultivar (Flat) increased in the vegetative stage but decreased in the Pishtaz cultivar. Therefore, the iron-efficient cultivar (Pishtaz) may utilize other bZIP transcription factors or other transcription factor families to increase the transcription of genes in the leaves in the vegetative stage. In general, this research helps understand the mechanism of plants coping with iron deficiency stress. Also, the identification of key bZIP transcription factors involved in the activation of genes participating in iron absorption and transport in bread wheat plants provides the possibility of genetic manipulation of bread wheat cultivars to produce varieties with a higher amount of iron in the grain.

**Keywords:** bZIP transcription factors, Bread wheat, Iron deficiency, Real time PCR



## تأثیر کمبود آهن بر بیان ژن‌های کدکننده عوامل رونویسی *bZIP4*، *bZIP79* و *bZIP97* در گندم نان (*Triticum aestivum* L.)

فاطمه اسد زاده<sup>۱\*</sup> و بابک عبدالهی مندولکانی<sup>۲\*</sup>

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

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۸/۰۲؛ تاریخ آخرین ویرایش: ۱۴۰۳/۰۲/۱۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۱۹؛ تاریخ انتشار برخط: ۱۴۰۳/۰۶/۳۱)

### چکیده

به منظور بررسی اثر کمبود آهن بر بیان ژن‌های کدکننده عوامل رونویسی *bZIP4*، *bZIP79* و *bZIP97* در ارقام آهن-کارا و آهن-ناکارا گندم نان، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار در گلخانه‌ی تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه اجرا شد. ارقام فلات (آهن-ناکارا) و پیشتاز (آهن-کارا) در شرایط کمبود و کفایت آهن خاک کشت و بیان ژن‌های کدکننده این سه عامل رونویسی در برگ و ریشه ارقام در دو مرحله یک ماه بعد از جوانه‌زنی (رویشی) و ۳۰ درصد سنبله‌دهی (زایشی) با روش Real time PCR اندازه‌گیری شد. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثرات متقابل رقم × اندام × مرحله نمونه‌برداری بر بیان هر سه ژن معنی‌دار بود. مقایسه میانگین اثر متقابل سه‌جانبه به روش SNK نشان داد که بیشترین میزان افزایش بیان نسبی (Fold change) ژن‌های *bZIP79* (بیش از ۱۴ برابر) و *bZIP97* (بیش از ۳ برابر کنترل)، به ترتیب در برگ رقم آهن-کارای پیشتاز و رقم آهن-ناکارای فلات در مرحله رویشی بود. بیشترین میزان بیان نسبی ژن کدکننده عامل رونویسی *bZIP4* (بیش از ۱۲ برابر کنترل) در ریشه رقم آهن-کارای پیشتاز در مرحله رویشی مشاهده شد که نشان می‌دهد احتمالاً این ژن در فعال‌سازی فرآیند بیان ژن‌های دخیل در جذب آهن از خاک در ریشه دخالت دارد. همچنین افزایش بیان ژن کدکننده عامل رونویسی *bZIP79* در برگ رقم آهن-کارای پیشتاز در مرحله رویشی تحت شرایط کمبود آهن، نشانگر دخالت این عامل رونویسی در فعال‌سازی رونویسی ژن‌های دخیل در انتقال آهن از برگ به دانه و سایر بافت‌های مصرف‌کننده آهن در شرایط کمبود آهن می‌باشد. بیان ژن *bZIP97* در برگ رقم آهن-ناکارای فلات در مرحله رویشی افزایش ولی در رقم پیشتاز کاهش یافت؛ بنابراین احتمالاً رقم آهن-کارای پیشتاز در مرحله رویشی در برگ از عوامل رونویسی دیگری از خانواده *bZIP* و یا خانواده‌های دیگر، برای افزایش رونویسی ژن‌های دخیل در جذب آهن استفاده می‌کند. به‌طور کلی این پژوهش، اطلاعات و شناخت محققین از مکانیسم مقابله گیاه با تنش کمبود آهن را افزایش می‌دهد. همچنین شناسایی عوامل رونویسی *bZIP* کلیدی دخیل در فعال‌سازی ژن‌های درگیر در جذب و انتقال آهن در گندم نان، امکان دست‌کاری ژنتیکی به منظور تولید ارقامی با میزان بیشتر آهن در دانه را فراهم می‌کند.

**واژگان کلیدی:** عوامل رونویسی، کمبود آهن، گندم نان، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی

\* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: [abdollahi@urmia.ac.ir](mailto:abdollahi@urmia.ac.ir)

## مقدمه

گندم اولین غله و مهم‌ترین محصول زراعی دنیا به‌شمار می‌رود (Kalhor, 2016; Abdoli, 2019) به‌طوری که ۱۷ درصد از زمین‌های زراعی جهان زیر کشت گندم می‌باشد (Mirzamasoumzadeh and Mollasadeghi, 2013). این گیاه بیش از ۲۰ درصد کالری مورد نیاز جمعیت دنیا را تأمین می‌کند که تقریباً نیمی از پروتئین یک‌سوم از جمعیت جهان را شامل می‌شود (Azizi et al., 2022). از این‌رو، شناخت سازوکار مولکولی رشد و توسعه گندم بخش عمده‌ای از پژوهش‌ها در حوزه ژنتیک مولکولی گیاهی را به خود اختصاص داده است. در این راستا نقش عناصر غذایی و تأثیر آن‌ها بر سوخت‌وساز گندم از جمله موضوعات مورد توجه تحقیقات علمی به‌شمار می‌رود (Wang et al., 2019).

امروزه ثابت شده است که عناصر غذایی کم‌مصرف با ایفای نقش در رشد و نمو و فتوسنتز گیاهان تأثیر قابل‌توجهی در افزایش عملکرد گیاهان زراعی دارند (Malakouti, 2007) و کمبود آن‌ها بر کیفیت و کمیت محصولات اثر می‌گذارد (Cole et al., 2010). عناصر کم‌مصرف نقش کاتالیزوری در واکنش‌ها ایفا می‌کنند و شرایط عمومی گیاهان را نیز بهبود می‌بخشند (Mahalleh and Roshdi, 2008).

آهن به‌عنوان چهارمین عنصر فراوان در پوسته زمین رتبه‌بندی می‌شود. با این‌که آهن در پوسته زمین فراوان است، اما حلالیت کم ترکیبات آهن در بیشتر خاک‌ها مانع جذب آهن توسط گیاه می‌شود (Lucena, 2006). در گیاهان، آهن به‌عنوان Redox فعال در بسیاری از واکنش‌های مهم فرآیندهای متابولیک از جمله فتوسنتز، تنفس میتوکندریایی، جذب نیتروژن و بیوستز هورمون‌ها نقش ایفا می‌کند (Wang et al., 2019). همچنین آهن در تثبیت نیتروژن و فعالیت آنزیم‌هایی مانند کاتالاز، پراکسیداز و سیتوکروم اکسیداز دخالت دارد (Menkir, 2008; Ranjbar et al., 2023). این عنصر همچنین در سنتز کلروفیل، تولید کربوهیدرات‌ها، احیای شیمیایی نیترات و سولفات، تنفس و تبدیل نیتروژن به اسیدهای آمینه، نقش مهمی دارد (Ruiz et al., 2000). نتایج برخی پژوهش‌ها نشان می‌دهد که

در شرایط کمبود آهن، به‌دلیل تولید ناکافی کلروفیل، بافت برگ کلروز ایجاد می‌شود که اغلب در اکثر غلات به‌صورت راه‌راه سبز در برگ‌های جوان‌تر دیده می‌شود (Maynard, 2007). همچنین کمبود این عناصر در برگ و دانه شدیداً روی مقدار گره‌های ریشه، تثبیت ازت و محصول‌دهی گیاه تأثیر می‌گذارد (Golestani Fard et al., 2015). علاوه بر این کمبود آهن در بدن انسان نیز منجر به بیماری‌هایی مانند کم‌خونی، کاهش ایمنی، افزایش مرگ مادر و کودک هنگام تولد و عقب‌ماندگی ذهنی می‌شود (Singh et al., 2017).

کمبود آهن به‌عنوان یکی از انواع تنش‌های غیرزیستی محسوب می‌شود. به‌طور کلی تنش‌های غیرزیستی شرایط طبیعی و فیزیولوژی گیاه را تغییر داده و موجب کاهش رشد و نمو در گیاهان می‌شود (Ayini et al., 2014; Nasiri et al., 2019). تنش‌های محیطی باعث به وجود آمدن واکنش‌هایی در گیاه از جمله تغییر در بیان ژن، کاهش رشد و عملکرد و تغییر متابولیسم سلول می‌شوند (Arkan et al., 2022). عدم تحرک در گیاهان باعث توسعه راهکارهایی جهت سازش با تنش‌های محیطی شده است (Sreenivasulua et al., 2007). دو استراتژی جذب آهن در گیاهان تک‌لپه و دولپه در شرایط کمبود آهن از جمله‌ی این سازش‌ها هستند. روند جذب آهن در ریشه گیاهان در شرایط کمبود آهن با تولید مواد کلات‌کننده آغاز می‌گردد. این کلاتورها  $Fe^{2+}$  و  $Fe^{3+}$  را کلات کرده و در اختیار گیاه قرار می‌دهند. همچنین گیاهان برای تبدیل  $Fe^{3+}$  به  $Fe^{2+}$  که قابلیت جذب بیشتری دارد، در بافت ریشه پروتون (احیاکننده) تولید کرده و به محیط ریشه پمپ می‌کنند (Ivanov et al., 2012).

یکی از کلیدی‌ترین عناصر ژنتیکی دخیل در پاسخ به انواع تنش‌های غیرزیستی از جمله تنش کمبود آهن، عوامل رونویسی (Transcription factors) می‌باشند (Nakashima et al., 2012; Rahaie et al., 2011). عوامل رونویسی به پروتئین‌هایی اطلاق می‌شود که به‌صورت اختصاصی به فعال‌کننده‌های اطراف ژن اتصال یافته و نقش مهمی در تنظیم فرآیندهای زیستی گیاه ایفا می‌کنند (Liu et al., 2012). این پروتئین‌ها پس از اتصال به توالی‌های تنظیم‌کننده در اطراف ژن، منجر به افزایش یا کاهش بیان

تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه اجرا شد. فاکتور اول شامل دو سطح آهن (کمبود و کفایت آهن به ترتیب ۱/۴ و ۱۰ میلی‌گرم آهن در کیلوگرم خاک) (Ashrafzadeh and Abdollahi Mandoulakani, 2023)، فاکتور دوم شامل دو رقم گندم آهن-کارا (پیش‌تاز) و آهن-ناکارا (فلات)، فاکتور سوم شامل دو اندام ریشه و برگ و فاکتور چهارم نمونه‌برداری در دو مرحله رویشی (یک ماه بعد از جوانه‌زنی) و زایشی (۵۸ روز بعد از کشت، ۳۰ درصد سنبله‌دهی) بود. نمونه‌های ریشه و برگ بعد از برداشت بلافاصله در ازت مایع فریز شده و سپس به فریز ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. خاک مورد استفاده (جدول ۱) از نواحی دارای کمبود آهن 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 (۱/۴ میلی‌گرم آهن در کیلوگرم خاک) و شاهد (۱۰ میلی‌گرم آهن در کیلوگرم خاک) اعمال شد. لازم به ذکر است که مقدار اولیه غلظت آهن خاک، ۱/۴ میلی‌گرم بود که برای تیمار کمبود استفاده شد. سپس آهن خاک با کود آهن سگسترین به ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک رسانده شد و به‌عنوان تیمار کفایت آهن استفاده شد. بذور از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر ایران تهیه و بعد از ضدعفونی با آب‌اکسیژنه یک‌درصد، در عمق ۴ سانتی-متری خاک گلدان‌ها کشت شد. ترکیب محلول غذایی که در طول آزمایش به گلدان‌ها داده شد در جدول ۲ آورده شده است.

ژن‌ها می‌شوند. خانواده‌ی bZIP (Basic Leucine Zipper) یکی از بزرگ‌ترین و متنوع‌ترین خانواده‌های عوامل رونویسی مهم در یوکاریوت‌ها به‌شمار می‌آید (Nijhawan *et al.*, 2008) و باعث کنترل بیان تعداد زیادی از ژن‌ها در زمان تنش می‌شود (Hwang *et al.*, 2014). عوامل رونویسی bZIP از یک دمین حفاظت‌شده ۴۰ تا ۸۰ اسیدآمینوای با یک ناحیه مرکزی که مسئول اتصال اختصاصی عامل رونویسی به DNA هدف و یک ناحیه زیپ‌لوسین که برای دایمیریزاسیون عامل رونویسی مورد نیاز است، تشکیل شده است (Shimizu *et al.*, 2005). باتوجه به اینکه تاکنون مطالعه‌ای در رابطه با بیان ژن‌های کدکننده عوامل رونویسی bZIP4، bZIP79 و bZIP97 در گندم نان تحت شرایط کمبود آهن انجام نشده است؛ هدف از تحقیق حاضر بررسی بیان نسبی ژن‌های کدکننده عوامل رونویسی bZIP4، bZIP79 و bZIP97 در برگ و ریشه ارقام آهن-کارا و آهن-ناکارا گندم نان در دو مرحله رشدی رویشی (یک ماه بعد از جوانه‌زنی) و زایشی (۳۰ درصد گلدهی) در شرایط کمبود آهن می‌باشد. لازم به یادآوری است که نقش این عوامل رونویسی در فعال‌سازی ژن‌های دخیل در جذب و انتقال روی در گندم نان در مطالعات پیشین (Ekhtiari and Abdollahi Mandoulakani, 2020) بررسی شده و سعی بر این است که در مطالعات آتی نقش سایر ژن‌های این خانواده نیز در شرایط کمبود آهن و روی در گندم نان مورد مطالعه قرار گیرد.

## مواد و روش‌ها

**کشت گیاه و اعمال تنش‌ها:** آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه

جدول ۱- ترکیبات خاک استفاده شده در تحقیق

Table 1. Characteristics of the soil used in the study

رس	سیلت	شن	بافت		هدایت الکتریکی	آهن	پتاسیم	فسفر قابل	کلسیم کربنات کوالانس کربن ارگانیک	
Clay	silt	sand	Texture	PH	EC	Fe	K	استفاده	OC	CCE
%	%	%			(ds/m)	(mg/kg)	(mg/kg)	P-Olsen	%	%
								(mg/kg)		
9	53	38	لومی-سیلتی (Silt-loam)	7.98	0.89	1.4	160	3.4	0.65	22

جدول ۲- ترکیب محلول غذایی مورد استفاده در آزمایش

Table 2. Composition of the nutrient solution used in the experiment

عنصر Element	مقدار (mg) Amount	کود Fertilizer	غلظت (mg/kg) Concentration
N	30	اوره (Urea)	65.22
P	50	سوپرفسفات تریپل (Triple superphosphate)	249
K	100	سولفات پتاسیم (Potassium sulfate)	223
Zn	5	سولفات روی (Zinc sulfate)	22.1
Cu	5	سولفات مس (Copper sulfate)	19.6
Fe	10	آهن سکوسترین (Sequestrene FE)	182

۶۰۰۰ (Qiagen، آمریکا) سنجش شد. واکنش Real time PCR در حجم ۱۲/۵ میکرولیتر طبق دستورالعمل کیت Sina Green HS-qPCR Mix, 2x(no ROX)100T-MM2042 (سیناکلون، ایران) انجام شد. چرخه زمانی-حرارتی جهت تکثیر ژن‌های مورد نظر، باتوجه به توالی آغازگر و اندازه محصول حاصل از تکثیر تعیین شد. بدین صورت که دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه در یک چرخه، جهت فعال‌سازی ابتدایی آنزیم استفاده شد. سپس ۴۰ چرخه شامل دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه جهت واسرشت‌سازی، ۳۰ ثانیه در دمای اتصال مربوط به هر آغازگر (جدول ۳) جهت اتصال آغازگر به رشته الگو و ۴۰ ثانیه دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد جهت تکثیر محصول انجام گردید. همچنین صحت تکثیر ژن‌های مورد نظر با استفاده منحنی ذوب مربوط به هر ژن و آنالیز ژل (شکل ۱) مورد بررسی قرار گرفت. از ژن اکتین به‌عنوان ژن مرجع استفاده شد (Ekhtiyari and Abdollahi Mandoulakani, 2020; Ashrafzadeh and Abdollahi Mandoulakani, 2023).

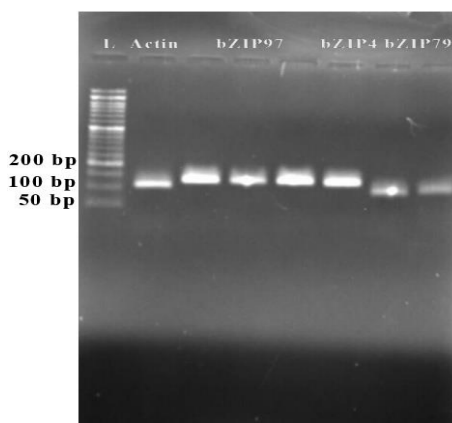
استخراج RNA و سنتز cDNA: استخراج RNA از برگ و ریشه گیاهان با استفاده از محلول استخراج RNX- plus<sup>TM</sup> (سیناکلون، ایران) بر اساس شیوه‌نامه شرکت سازنده صورت گرفت. در این تحقیق سه تکرار زیستی و فنی در نظر گرفته شد. کمیت و کیفیت RNA استخراجی با استفاده از نانودراپ و الکتروفورز-ژل آگارز یک درصد بررسی شد. برای سنتز cDNA از کیت Easy cDNA reverse transcription Kit (پارس طوس، ایران) مطابق شیوه‌نامه پیشنهادی شرکت سازنده استفاده شد. همچنین قبل از سنتز cDNA، تیمار DNase I برای حذف آلودگی DNA ژنومی انجام شد.

طراحی آغازگر و واکنش Real time PCR: به‌منظور بررسی بیان نسبی ژن‌های *bZIP4*، *bZIP79* و *bZIP97* با روش Real time PCR از آغازگرهای اختصاصی (جدول ۳) استفاده شد. بیان این ژن‌ها در شرایط کمبود آهن نسبت به شاهد با دستگاه gene Q-Pure Detection-Qiagen مدل

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

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

ژن Gene	شماره دسترسی Accession number	توالی آغازگرها Primer sequence (5' - 3')	دمای اتصال Annealing temperature (C°)	اندازه محصول (جفت‌باز) Amplicon length (bp)
<i>Actin3</i>	TC234027	F: GACGCACAACAGGTATCGTGTT R: AGCGAGGTCAAGACGAAGGAT	58	107
<i>bZIP4</i>	AA0029470	F: CTGCTTCAACAATGGCAACTC R: TCATCGAACCTGTAATCCGCAG	60	129
<i>bZIP79</i>	AA0749730	F: GAGGAGAATCTAGCTTGTGGC R: TACACGCTAGGAACTCATCGAAGC	60	87
<i>bZIP97</i>	AA1379610	F: AGAACGTCGATTTGGTTTCTGG R: CGATAGTTCTCATCTGCATTCTCG	60	126



شکل ۲- باندهای حاصل از تکثیر cDNA با آغازگرهای ژن‌های *Actin*، *bZIP97*، *bZIP4* و *bZIP79*

Figure 2. Bands amplified using cDNA samples by specific primers for *Actin*, *bZIP97*, *bZIP4* and *bZIP79* genes

### نتایج و بحث

تجزیه‌وارینانس (جدول ۳) داده‌های حاصل از بیان نسبی ژن‌های *bZIP4*، *bZIP79* و *bZIP97* در ارقام پیش‌تاز و فلات در شرایط کمبود آهن نشان می‌دهد که اثرات متقابل سه جانبه رقم × اندام × مرحله نمونه‌برداری در سطح احتمال یک‌درصد معنی‌دار می‌باشد؛ بنابراین مقایسه میانگین بر اساس آزمون SNK برای اثرات متقابل سه‌جانبه انجام گرفت.

**بیان نسبی ژن *bZIP4*:** نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل سه-جانبه رقم × بافت × مرحله نمونه‌برداری نشان داد که بیشترین میزان افزایش بیان نسبی ژن *bZIP4* (۱۲/۵۲) FC در شرایط کمبود آهن در ریشه رقم آهن-کارای پیش‌تاز در مرحله رویشی مشاهده شد. همچنین بیان نسبی این ژن در رقم آهن-ناکارا فلات در همین مرحله در ریشه در شرایط کمبود آهن کاهش یافت (شکل ۲).

جهت به‌دست آوردن کمیت نسبی از نرم‌افزار Rotor-Gene Q استفاده شد. بدین‌صورت که در واکنش Real time PCR با افزایش تشعشع فلورسنس در نرم‌افزار Rotor-Gene Q کمیت نسبی مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. پس از اتمام واکنش‌ها مقدار Threshold طوری در نظر گرفته شد که سیگنال‌های فلورسنت را در فاز نمایی واکنش قطع کند. پس از به‌دست آوردن Ct، میزان بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه در شرایط کمبود آهن نسبت به‌کفایت آن با روش  $\Delta\Delta Ct$  محاسبه شد (Livak and Schmittgen, 2001). همچنین جهت بررسی نرمال بودن توزیع داده‌های حاصل و خطاهای آزمایشی از روش کلموگراف-اسمیرنوف در نرم‌افزار Minitab (نسخه ۱۹) استفاده شد. تجزیه واریانس داده‌ها و مقایسه میانگین‌ها به روش SNK (Student Newman Keuls) با استفاده از نرم‌افزار SAS (نسخه ۹/۴) انجام شد.

جدول ۴- تجزیه واریانس داده‌های حاصل از بیان نسبی ژن‌های *bZIP4*، *bZIP79* و *bZIP97* در ریشه و برگ ارقام پیشتاز (آهن-کارا) و فلات (آهن-ناکارا) گندم نان در مراحل رویشی و زایشی در شرایط کمبود آهن

Table 4. Analysis of variance for the relative of expression for *bZIP4*, *bZIP79* and *bZIP97* genes in root and leaf of Pishtaz (Fe-efficient) and Falat (Fe-inefficient) bread wheat cultivars at vegetative and reproductive stages under Fe deficiency conditions

منابع تغییرات Sources of variations	میانگین مربعات Mean of squares			
	درجه آزادی Degree of freedom	<i>bZIP4</i>	<i>bZIP79</i>	<i>bZIP97</i>
رقم Cultivar (C)	1	4.61 <sup>ns</sup>	44.48**	1.55*
بافت Tissue (T)	1	35.91**	**19.01	1.12*
مرحله Stage (S)	1	22.58**	44.55**	0.33 <sup>ns</sup>
رقم × بافت C × T	1	41.50**	33.52**	3.90**
رقم × مرحله C × S	1	81.04**	103.5**	1.01*
بافت × مرحله T × S	1	19.70**	36.42**	4.65**
رقم × بافت × مرحله C × T × S	1	68.02**	11.60**	2.02**
خطا Error	16	7.09	3.48	1.15
ضریب تغییرات (%) Coefficient of variation (%)		27.82	20.17	22.04

<sup>ns</sup>، \* و \*\*: به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌داری در سطح احتمال پنج و یک درصد.

<sup>ns</sup>، \* and \*\*: Non-significant and significant at 5 and 1% probability levels, respectively.

زایشی در ریشه و برگ رقم فلات نشان می‌دهد احتمالاً رقم آهن-کارا پیشتاز در مرحله زایشی از عوامل رونویسی دیگری برای افزایش رونویسی ژن‌های دخیل در جذب آهن از خاک در ریشه و انتقال آن از برگ به بافت‌های مصرف‌کننده در شرایط کمبود آهن استفاده می‌کند.

نتایج مطالعه جاکبی و همکاران (Jakoby *et al.*, 2002) نشان می‌دهد ژنوم آراییدوپسیس دارای ۷۵ ژن *bZIP* می‌باشد که با توجه به نوع عملکرد و تشابه توالی به ده گروه تقسیم می‌شوند (Jakoby *et al.*, 2002). لویز و همکاران (López-Berges *et al.*, 2021) در قارچ *Verticillium dahliae* گزارش کردند که عوامل رونویسی *bZIP* و

افزایش بیان ژن کدکننده این عامل رونویسی در ریشه رقم آهن-کارای پیشتاز گندم نان در مرحله رویشی تحت شرایط کمبود آهن خاک، احتمالاً نشانگر دخالت این عامل رونویسی در فعال‌سازی رونویسی ژن‌های دخیل در جذب آهن از خاک در ریشه باشد. البته بیان این ژن در برگ رقم آهن-ناکارای فلات در مرحله رویشی افزایش، ولی در رقم پیشتاز کاهش یافت؛ بنابراین احتمالاً رقم آهن-کارا پیشتاز در مرحله رویشی در برگ از عوامل رونویسی دیگری برای افزایش رونویسی ژن‌های دخیل در انتقال آهن از برگ به دانه و سایر بافت‌های مصرف‌کننده آهن در شرایط کمبود آهن استفاده می‌کند. همچنین افزایش بیان این ژن در مرحله



برگ به اندام‌های گیاهی دخالت دارند. بیشترین افزایش بیان این ژن مربوط به بافت برگ می‌باشد. همچنین بیان این ژن در ریشه رقم فلات در مرحله زایشی افزایش یافت که نشانگر این است که رقم آهن-کارا پیش‌تاز در مرحله زایشی در ریشه از عوامل رونویسی دیگری از خانواده bZIP و یا خانواده‌های دیگر برای افزایش رونویسی ژن‌های دخیل در جذب آهن استفاده می‌کنند.

مطالعه کاویتها و همکاران (Kavitha et al., 2015) نشان داد که عوامل رونویسی خانواده bZIP در پاسخ به تنش کمبود عناصر کم‌مصرف مانند آهن و روی در برنج نقش دارند. آسوانکائو و همکاران (Assunção et al., 2001). گزارش کردند که در گیاه آراییدوپسیس بیان ژن‌های کدکننده عوامل رونویسی AtbZIP19 و AtbZIP23 تحت شرایط کمبود روی نسبت به شرایط کنترل دو برابر شد در حالی که بیان ژن AtbZIP24، یکی دیگر از اعضای گروه F این عوامل رونویسی تحت همین شرایط تغییری نکرد.

در مطالعه‌ای دیگر تیموری راد و عبدالهی مندولکانی (Teymouri Rad et al., 2022) گزارش کردند که بیشترین میزان افزایش بیان ژن bZIP4 در شرایط کمبود روی، در مرحله زایشی در برگ رقم روی-کارا مشاهده می‌شود. در مطالعه مذکور بیشترین میزان بیان نسبی ژن bZIP56 در ریشه رقم هامون در مرحله زایشی مشاهده شد.

**بیان نسبی ژن bZIP97** نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل رقم × بافت × مرحله نمونه‌برداری بر بیان ژن bZIP97 نشان داد که بیشترین میزان افزایش بیان نسبی این ژن (بیش از  $FC = 3/48$ ) مربوط به برگ رقم آهن-ناکارای فلات در مرحله رویشی می‌باشد. در ریشه رقم پیش‌تاز در مرحله رویشی نیز میزان بیان نسبی این ژن افزایش یافت. همچنین در مرحله رویشی در ریشه و مرحله زایشی در ریشه هر دو رقم بیان این ژن به‌طور قابل‌توجهی افزایش یافت ولی اختلاف معنی‌داری بین این دو رقم به لحاظ میزان بیان این ژن مشاهده نگردید. در مرحله زایشی در بافت برگ هر دو رقم، بیان این ژن کاهش یافت و اختلاف معنی‌داری بین این دو رقم در این مرحله به لحاظ میزان بیان این ژن

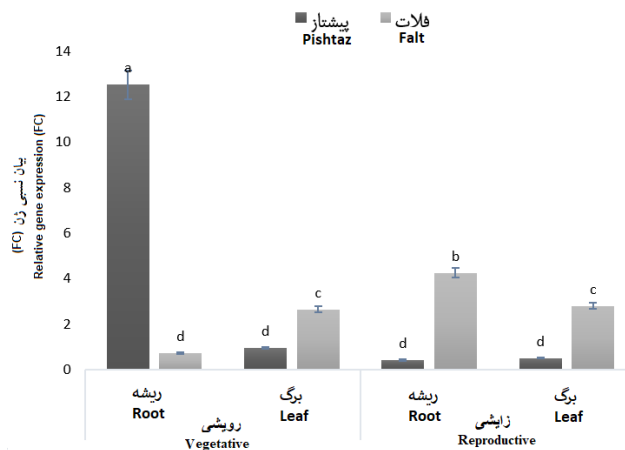
VdHapX به‌عنوان تنظیم‌کننده هموستازی آهن برای سازگاری با شرایط کمبود آهن و کفایت آهن عمل می‌کنند. همچنین سینکلر و همکاران (Sinclair et al., 2018) نشان دادند که عوامل رونویسی bZIP19/23 در جو نقش بسزایی در انتقال روی از ریشه به ساقه دارند و نتیجه‌گیری کردند که این عوامل رونویسی به وضعیت روی در ریشه و ساقه پاسخ می‌دهند. اشرفزاده و عبدالهی مندولکانی (Ashrafzadeh and Abdollahi Mandoulakani, 2023) بیان نمودند که افزایش بیان نسبی ژن bZIP56 در ریشه ارقام آهن-کارا و آهن-ناکارا گندم در مرحله زایشی نشانگر این است که احتمالاً این ژن در فعال‌سازی رونوشت‌برداری ژن‌های دخیل در جذب آهن از خاک در انتهای مراحل رشدی گیاه (مرحله پر شدن دانه) دخالت دارد.

**بیان نسبی ژن bZIP79** بر اساس نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل سه‌جانبه رقم × بافت × مرحله نمونه‌برداری، بیشترین میزان افزایش بیان نسبی ژن bZIP79 ( $14/04 = FC$ ) در شرایط کمبود آهن در برگ رقم آهن-کارای پیش‌تاز در مرحله رویشی مشاهده شد. همچنین بیان نسبی این ژن در ریشه رقم آهن-کارای پیش‌تاز نیز در مرحله رویشی مشاهده شد که به‌طور معنی‌داری بیشتر از رقم آهن-ناکارای فلات بود. البته در مرحله زایشی در ریشه در رقم آهن-ناکارای فلات افزایش معنی‌داری در بیان این ژن مشاهده شد ولی در مرحله رویشی بیان این ژن در رقم فلات کاهش یافت (شکل ۳).

افزایش معنی‌دار بیان ژن کدکننده این عامل رونویسی در شرایط کمبود آهن در برگ رقم آهن-کارای پیش‌تاز در مرحله رویشی نسبت به رقم آهن-ناکارای فلات، احتمالاً نشانگر دخالت این عامل رونویسی در فعال‌سازی رونویسی ژن‌های دخیل در انتقال آهن از برگ به دانه و سایر بافت‌های مصرف‌کننده آهن در شرایط کمبود آهن باشد. همچنین در برگ مرحله زایشی بین دو رقم تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد که عدم وجود اختلاف معنی‌دار در بیان این ژن در برگ بین دو رقم نشان می‌دهد که احتمالاً ژن‌های bZIP دیگری در رقم آهن-کارا در انتقال آهن از

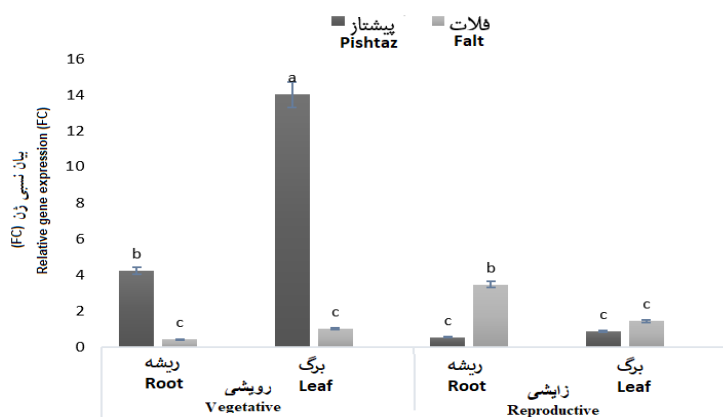
به سایر اندام‌های گیاه در شرایط کمبود آهن استفاده می‌کند. همچنین افزایش بیان این ژن در ریشه هر دو رقم در مرحله زایشی و کاهش هم‌زمان بیان آن در برگ هر دو رقم نشان می‌دهد احتمالاً این ژن در فعال‌سازی رونوشت‌برداری ژن‌های دخیل در جذب آهن از خاک در ریشه در انتهای مرحله رشدی گیاه (در مرحله‌ی پرشدن دانه) دخالت دارد (شکل ۴).

مشاهده نشد. همچنین در شرایط کمبود آهن، بیان این ژن در برگ در مرحله‌ی رویشی در رقم آهن-ناکارای فلات افزایش یافت که تفاوت معنی‌داری نسبت به رقم آهن-کارای پیشتاز داشته به طوری که افزایش بیان ژن کدکننده این عامل رونویسی احتمالاً نشانگر این است که رقم آهن-کارا پیشتاز در مرحله رویشی از عوامل رونویسی دیگری برای افزایش رونویسی ژن‌های دخیل در انتقال آهن از برگ



شکل ۲- مقایسه میانگین (بر اساس آزمون SNK) اثر متقابل بافت × رقم × مرحله‌ی نمونه‌برداری بر بیان نسبی ژن کدکننده عامل رونویسی *bZIP4* در ریشه و برگ ارقام آهن-کارا (پیش‌تاز) و آهن-ناکارا (فلات) گندم نان در مراحل رویشی و زایشی در شرایط کمبود آهن (ستون‌های دارای حروف مشترک اختلاف معنی‌دار ندارند)

Figure 2. Mean comparison (based on SNK test) for cultivar × tissue × sampling stage interaction on the relative expression of gene *bZIP4* in Fe-efficient (Pishtaz) and -inefficient (Falat) bread wheat cultivars under Fe deficiency conditions (Columns with common letters do not have significant differences).

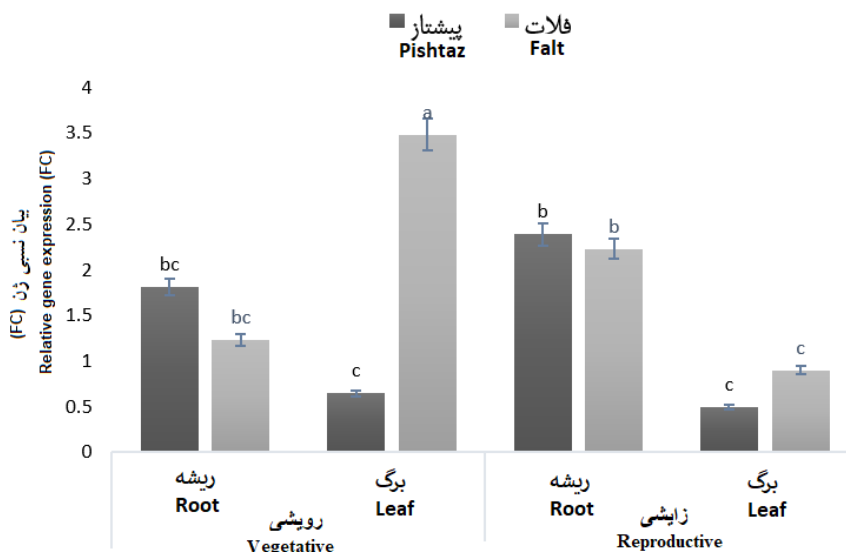


شکل ۳- مقایسه میانگین (بر اساس آزمون SNK) اثر متقابل بافت × رقم × مرحله‌ی نمونه‌برداری بر بیان نسبی ژن کدکننده عامل رونویسی *bZIP79* در ارقام آهن-کارا (پیش‌تاز) و آهن-ناکارا (فلات) گندم نان در مراحل رویشی و زایشی در شرایط کمبود آهن (ستون‌های دارای حروف مشترک اختلاف معنی‌دار ندارند)

Figure 3. Mean comparison (based on SNK test) for cultivar × tissue × sampling stage interaction on the relative expression of gene *bZIP79* in Fe-efficient (Pishtaz) and -inefficient (Falat) bread wheat cultivars under Fe deficiency conditions (Columns with common letters do not have significant differences).

*bZIP97* در ریشه در شرایط کمبود روی، احتمالاً وظیفه اصلی ژن *bZIP4* فعال‌سازی ناقل‌های دخیل در انتقال روی در گیاه و نقش ژن‌های *bZIP79* و *bZIP97* فعال‌سازی ناقل‌های دخیل در جذب روی از خاک در شرایط کمبود روی می‌باشد. به‌طور کلی یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که افزایش بیان ژن کدکننده *bZIP4* در ریشه رقم آهن-کارای پیشتاز گندم نان در مرحله رویشی تحت شرایط کمبود آهن خاک، احتمالاً نشانگر دخالت این عامل رونویسی در فعال‌سازی رونویسی ژن‌های دخیل در جذب آهن از خاک در ریشه می‌باشد. بیشترین میزان افزایش بیان نسبی ژن *bZIP79* ( $FC = 14/04$ ) در شرایط کمبود آهن در برگ رقم آهن-کارای پیشتاز در مرحله رویشی مشاهده شد که افزایش معنی‌دار بیان ژن کدکننده این عامل رونویسی در شرایط کمبود آهن در برگ رقم آهن-کارای پیشتاز در مرحله رویشی نسبت به رقم آهن-ناکارای فلات، احتمالاً نشانگر دخالت این عامل رونویسی در فعال‌سازی رونویسی ژن‌های دخیل در انتقال آهن از برگ به دانه و سایر بافت‌های مصرف‌کننده آهن در شرایط کمبود آهن می‌باشد.

نتایج پژوهش نظری و همکاران (Nazri et al., 2017) که روی جو تحت شرایط کمبود روی صورت گرفت مشخص نمود که عوامل رونویسی *bZIP1*، *bZIP10* و *bZIP58* در ریشه و شاخه جو بیان می‌شوند در حالی که ژن کدکننده *HvbZIP57* تنها در ریشه به میزان کمی بیان شد. اونس و همکاران (Evens et al., 2017) اهمیت گروه F از عوامل رونویسی *bZIP* و ژن‌های *ZIP* را در پاسخ به کمبود روی در گندم نان بررسی کردند. در این تحقیق مذکور بیان چهار ژن *bZIPF4-7AL*، *bZIPF4-7DL*، *bZIPF1-7DL* و *bZIPF3b-7BL* مطالعه شد. این ژن‌ها تحت شرایط کمبود روی در ریشه و اندام‌های هوایی گیاه بیان شدند، اما میزان بیان آن‌ها متفاوت بود. این گزارش‌ها نشان می‌دهند که ژن‌های رمزکننده‌ی عوامل رونویسی *bZIP* در تنش کمبود روی در گیاهان نیز همانند سایر تنش‌های زیستی و غیرزیستی نقش اساسی دارند (Evens et al., 2017). اختیاری و عبدالهی مندولکانی (Ekhtiari and Abdollahi, 2020) گزارش کردند که باتوجه به افزایش بیان معنی‌دار ژن *bZIP4* در برگ و ژن‌های *bZIP79* و



شکل ۴- مقایسه میانگین (بر اساس آزمون SNK) اثر متقابل بافت × رقم × مرحله‌ی نمونه‌برداری بر بیان نسبی ژن کدکننده عامل رونویسی *bZIP97* در ارقام آهن-کارا (پیشتاز) و آهن-ناکارا (فلات) گندم نان در مراحل رویشی و زایشی در شرایط کمبود آهن (ستون‌های دارای حروف مشترک اختلاف معنی‌دار ندارند).

Figure 4. Mean comparison (based on SNK test) for cultivar × tissue × sampling stage interaction on the relative expression of *bZIP97* in Fe-efficient (Pishtaz) and -inefficient (Falt) bread wheat cultivars under Fe deficiency conditions (Columns with common letters do not have significant differences).

آهن را افزایش می‌دهد. همچنین شناسایی عوامل رونویسی bZIP کلیدی دخیل در فعال‌سازی ژن‌های درگیر در جذب و انتقال آهن در گندم نان، امکان دست‌کاری ژنتیکی به منظور تولید ارقامی با میزان بیشتر آهن در دانه را فراهم می‌کند.

### سپاس‌گزاری

از گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه، به دلیل فراهم نمودن هزینه و امکانات لازم برای انجام تحقیق حاضر نهایت تشکر و قدردانی می‌شود.

در شرایط کمبود آهن، بیان ژن *bZIP97* در برگ در مرحله‌ی رویشی در رقم آهن-ناکارای فلات افزایش یافت که تفاوت معنی‌داری نسبت به رقم آهن-کارای پیش‌تاز داشته به طوری که افزایش بیان ژن کدکننده این عامل رونویسی احتمالاً نشانگر این است که رقم آهن-کارا پیش‌تاز در مرحله رویشی از عوامل رونویسی دیگری برای افزایش رونویسی ژن‌های دخیل در انتقال آهن از برگ به اندام‌های گیاه در شرایط کمبود آهن استفاده می‌کند. به طور کلی یافته‌های این پژوهش، اطلاعات و شناخت محققین از مکانیسم مقابله گیاه با تنش کمبود

### References

- Abdoli, M.** (2019). Remobilization of photoassimilates a strategy to deal with drought stress in wheat. *Plant Production and Genetics*, **2(1)**: 87-104 (In Persian).
- Arkan, M., Mirakhorli, N., Shabani, L., Dababat, A.A.** (2022). The effect of drought stress, *Fusarium culmorum* and *Heterodera filipjevi* and Their interactions on the expression pattern of Transcription factor gene *nac69-3* in Bread wheat. *Journal of Crop Breeding*, **14(41)**: 42-52 (In Persian).
- Ashrafzadeh, N. and Abdollahi Mandoulakani, B.** (2023). The effect of Iron deficiency on the relative expression of genes encoding transcription factors *bZIP56*, *WRKY1* and *NAM-B1* in bread wheat (*Triticum aestivum* L.), *Journal of Crop Breeding*, **15(45)**: 194-204 (In Persian).
- Assunção, A.G.L., Martins, P.D.C., De Folter, S., Vooijs, R., Schat, H. and Aarts, M.G.M.** (2001). Elevated expression of metal transporter genes in three accessions of the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant, Cell & Environment*, **24(2)**: 217-226.
- Ayini, M., Khodakaramian, G., Mirzayi, H. and Esmailzadeh, A.** (2014). Biological and abiotic stresses in plants. *National Conference on Climate Change and Sustainable Development Engineering of Agriculture and Natural Resources*, Tabriz, Iran.
- Azizi, K., Chehregani Rad, A. and Soltani, J.** (2022). Structural changes of root, stem and leaf tissues in *Triticum aestivum* cv. Mihan, under drought stress. *Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*, **35(3)**: 393-404 (In Persian).
- 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. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **91(4)**: 1027-1034.
- Ekhtiyari, M., and Abdollahi Mandoulakani, B.** (2020). Effect of Zn deficiency stress on expression pattern of genes encoding *bZIP4*, *bZIP79* and *bZIP97* transcription factors in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Iranian Journal of Crop Sciences*, **21(4)**: 344-353 (In Persian).
- Evens, N.P., Buchner, P., Williams, L.E. and Hawkesford, M.J.** (2017). The role of ZIP transporters and group F bZIP transcription factors in the Zn-deficiency response of wheat (*Triticum aestivum*). *The Plant Journal*, **92(2)**: 291-304.
- Golestani Fard, A., Mir Seyed Hosseini, H., Aryan, A., Abbaszadeh Dahaji, P., Tafizi, M. and Salari Bardsiri, N.** (2015). Changes of chemical forms of Zinc in the rhizosphere of some turnip and radish cultivars. *Journal of Soil Management and Sustainable Production*, **4(4)**: 193-214 (In Persian).
- Hwang, I., Jung, H.J., Park, J.I., Yang, T.J., and Nou, I.S.** (2014). Transcriptome analysis of newly classified bZIP transcription factors of *Brassica rapa* in cold stress response. *Genomics*, **104(3)**: 194-202.
- Ivanov, R., Brumbarova, T. and Bauer, P.** (2012). Fitting into the harsh reality: regulation of iron-deficiency responses in dicotyledonous plants. *Molecular Plant*, **5(1)**: 27-42.

- Jakoby, M., Weisshaar, B., Dröge-Laser, W., Vicente-Carbajosa, J., Tiedemann, J., Kroj, T. and Kalhor, S.** (2016). Investigating the short-term and long-term relationship between CO<sub>2</sub> emissions and Food security in Iran. M.Sc. Thesis Faculty of Agriculture, Urmia University, Isfahan, Iran (In Persian).
- Kavitha, P., Kuruvilla, S. and Mathew, M.** (2015). Functional characterization of a transition metal ion transporter, OsZIP6 from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, **97**: 165-174.
- Liu, Y., He, Z., Appels, R. and Xia, X.** (2012). Functional markers in wheat: current status and future prospects. *Theoretical and Applied Genetics*, **125**: 1-10.
- López-Berges, M.S., Scheven, M.T., Hortschansky, P., Misslinger, M., Baldin, C., Gsaller, F. and Haas, H.** (2021). The bZIP transcription factor HapX is post-translationally regulated to control iron homeostasis in *Aspergillus fumigatus*. *International Journal of Molecular Sciences*, **22(14)**: 7739.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCT</sup> method. *Methods*, **25(4)**: 402-408.
- Lucena, J.J.** (2006). Synthetic iron chelates to correct iron deficiency in plants. In: Barton, L.L. and Abadía, J., Eds., *Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms*. pp.103-128. Springer, Dordrecht, NL.
- Mahalleh, J.K. and Roshdi, M.** (2008). Effect of foliar application of micro nutrients on quantitative and qualitative characteristics of 704 silage corn in Khoy. *Seed and Plant Improvement Journal*, **24(2)**: 281-293 (In Persian).
- 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.
- Maynard, D.N.** (2007). *Handbook of plant nutrition. Horticultural Science*, **42(2)**: 422b-423.
- Menkir, A.** (2008). Genetic variation for grain mineral content in tropical-adapted maize inbred lines. *Food Chemistry*, **110(2)**: 454-464.
- Mirzamasoumzadeh, B. and Mollasadeghi, V.** (2013). Effects of osmotic stress on chlorophyll and proline different wheat cultivars. *Journal of Research in Science Engineering and Technology*, **1(1)**: 12-13.
- Nakashima, K.H., Takasaki, J., Mizoi, K., Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2012). NAC transcription factors in Plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1819(2)**: 97-103.
- Nasiri, E., Sabouri, A., Forghani, A. and Esfahani, M.** (2019). Grouping of rice genotypes based on grain iron, zinc, manganese and protein and performance measurement of linked microsatellite markers. *Plant Genetic Researches*, **5(2)**: 73-84 (In Persian).
- Nazri, A. Z., Griffin, J.H., Peaston, K.A., Alexander-Webber, D.G., and Williams, L.E.** (2017). F-group bZIPs in barley—a role in Zn deficiency. *Plant, Cell & Environment*, **40(11)**: 2754-2770.
- Nijhawan, A., Jain, M., Tyagi, A. K. and Khurana, J.P.** (2008). Genomic survey and Gene expression analysis of the basic leucine zipper transcription factor family in Rice. *Plant Physiology*, **146(2)**: 333-350.
- Rahaie, M., Gomarian, M., Alizadeh, H., Malboobi, M. A. and Naghavi, M.R.** (2011). The expression analysis of transcription factors under long term salt stress in tolerant and susceptible wheat genotypes using reverse northern blot technique. **13(3)**: 580-595 (In Persian).
- 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 (In Persian).
- Ruiz, J.M., Baghour, M. and Romero, L.** (2000). Efficiency of the different genotypes of tomato in relation to foliar content of Fe and the response of some bioindicators. *Journal of Plant Nutrition*, **23(11-12)**: 1777-1786.
- Shimizu, H., Sato, K., Berberich, T., Miyazaki, A., Ozaki, R., Imani, R., Kusano, T.** (2005). LIP19, a basic region leucine zipper protein, is a Fos-like molecular switch in the cold signaling of rice plants. *Plant and Cell Physiology*, **46(10)**: 1623-34.
- 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.

- Singh, S.P., Keller, B., Grissem, W. and Bhullar, N.K.** (2017). Rice *NICOTIANAMINE SYNTHASE 2* expression improves dietary iron and Zinc levels in Wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, **130(2)**: 283-292.
- Sreenivasulu, N., Sopory, S.K., and Kishor, P.K.** (2007). Deciphering the regulatory mechanisms of abiotic stress tolerance in plants by genomic approaches. *Gene*, **388(1-2)**: 1-13.
- Teymouri Rad, L., Fayaz Moghaddam, A., Abdollahi Mandoulakani, B. and Wehbi, E.** (2022). Expression pattern of genes encoding bZIP56, WRKY1 and NAM-B1 transcription factors under Zn deficiency conditions in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Crop Breeding*, **14(42)**: 106-116 (In Persian).
- 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.