

مطالعه الگوی بیان برخی عوامل رونویسی در گندم تحت تنش خشکی و تأثیر نانوذره روی

سیده یلدا رئیسی‌ساداتی^۱، سدابه جهانبخش گده‌کهریز^{۲*}، علی عبادی^۳، محمد صدقی^۳

۱- دانشجوی دکتری، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل

۲- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل

۳- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۴/۰۴ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۲۹)

چکیده

در شرایط تنش خشکی، سیستم علامت‌دهنده موجب القای بیان ژن‌های مشخصی در مقابل اثرات زیان‌آور تنش‌های محیطی می‌شود. در میان ریزعناصر ضروری برای رشد و نمو گیاهان، عنصر روی نقش مهمی در بسیاری از فرآیندهای متابولیکی گیاهان از جمله بیان ژن و تحمل به تنش دارد. به منظور بررسی اثر تنش خشکی و نانوآکسید روی بر الگوی بیان نسبی برخی ژن‌های دخیل در تنش‌های غیرزنده (شامل *ZIP1*، *HMA2*، *WRKY1*) ارقام گندم، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار در گلخانه اجرا شد. در این آزمایش، فاکتور اول تنش خشکی در سه سطح (۳۵، ۶۰ و ۸۵ درصد ظرفیت زراعی)، فاکتور دوم شامل سه رقم گندم (حیدری، میهن و سای‌سونز) و فاکتور سوم شامل نانوآکسید روی در سه سطح (۰، ۰/۵ و ۱ گرم بر لیتر) بود. براساس نتایج بدست آمده، با افزایش شدت تنش خشکی، بیان نسبی ژن‌های *ZIP1* و *WRKY1* در رقم متحمل به خشکی (میهن) و نیز با افزایش غلظت نانوذره روی زمان تنش، بیان ژن *ZIP1* در رقم حساس به خشکی (سایسونز) افزایش پیدا کرد. بیشترین میزان بیان نسبی ژن *HMA2* در رقم حیدری تحت تنش خشکی ملایم ملاحظه شد. بطور کلی، بیان هر سه ژن مورد مطالعه در رقم متحمل (میهن) تحت تنش خشکی افزایش یافت. افزایش سطح بیان ژن‌های *HMA2* و *ZIP1* می‌تواند مرتبط با انتقال روی به بافت‌های مصرف‌کننده و همچنین افزایش مصرف روی در سوخت و ساز جاری گیاه باشد که در نتیجه در افزایش تحمل گیاه گندم به تنش خشکی مؤثر است.

واژگان کلیدی: بیان ژن، تنش خشکی، عوامل رونویسی، گندم، نانوذره روی

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: jahanbakhsh@uma.ac.ir

مقدمه

گندم (*Triticum aestivum* L.) یکی از مهم ترین گیاهان زراعی با اهمیت غذایی و اقتصادی در جهان و ایران است. این گیاه به عنوان مهم ترین منبع تأمین کربوهیدرات انسان، غذای حدود نیمی از مردم دنیا را تشکیل می دهد و در اغلب کشورهای جهان کشت می شود (Pask et al., 2014; Vishwakarma et al., 2014). خشکی یکی از مهم ترین عوامل محدود کننده رشد و تولید محصول گیاهان زراعی در اکثر نقاط جهان و ایران است و به عنوان یک تنش چندبعدی گیاهان را در سطوح مختلف تحت تأثیر قرار می دهد (Rebey et al., 2012). حدود ۲۶ درصد از اراضی تحت کشت در سراسر جهان با تنش خشکی روبرو هستند. این در حالی است که کشور ایران با متوسط بارندگی حدود ۲۵۰ میلی متر دارای ۱/۲ درصد خشکی های جهان می باشد. تنش خشکی یکی از علل اصلی خسارت به گیاهان زراعی در سرتاسر جهان از طریق کاهش میانگین عملکرد تا میزان ۵۰ درصد می باشد. تنش خشکی مانع از تظاهر کامل پتانسیل ژنتیکی گیاهان زراعی و باعث تولید گونه های فعال اکسیژن می شود (Poormohammad Kiani et al., 2009). یکی دیگر از اثرات تنش خشکی برهم زدن تعادل تغذیه ای در گیاه است به طوری که فراهم کردن مواد غذایی از طریق ریشه محدود می شود (Cakmak, 2008). لذا برای رفع این مشکل می توان با تکمیل مصرف عناصر غذایی از طریق محلول پاشی، وضعیت رشد گیاه را در شرایط تنش بهبود بخشید (Paygzar et al., 2009). یکی از مهم ترین کاربردهای فناوری نانو در جنبه های مختلف از جمله در بخش آب و خاک کشاورزی، استفاده از نانو کودها برای تغذیه گیاهان است (Davoodi et al., 2013). روی نیز یکی از عناصر ضروری برای گیاهان است که به عنوان یک کوفاکتور عملکردی، ساختاری و تنظیمی در ارتباط با متابولیسم ساکاریدها، فتوسنتز و ساخت پروتئین در گیاهان نقش دارد. روی در تنظیم بیان ژن در تحمل به تنش های محیطی نقش مهمی دارد (Karami et al., 2016; Abbasi et al., 2016). عنصر روی به همراه آهن به عنوان کوفاکتور

آنزیم های آنتی اکسیدان، موجب افزایش این آنزیم ها شده و نقش مهمی در تعدیل رادیکال های آزاد و آثار تخریبی آن ها در سیستم های غشایی دارند، که تحمل گیاهان را به تنش خشکی افزایش می دهند (Narimani et al., 2018). کاربرد عناصر ریزمغذی همچون روی منجر به ایجاد مقاومت گیاه به تنش خشکی می گردد (Karim and Rahman, 2015). توانایی ارقام مختلف گیاهان برای رشد و تولید عملکرد بالا در خاک هایی که دچار کمبود روی می باشند، متفاوت است. علت فیزیولوژیکی این تحمل که کارایی روی (Zinc efficiency) نامیده می شود، به طور کامل مشخص نشده است (Khoshgoftarmansh et al., 2010). در شرایط کم آبی گیاهان پس از بروز تنش در سطح مولکولی، سیستم علامت دهنده موجب القای ژن های مشخصی از جمله عوامل رونویسی در مقابل اثرات زیان آور تنش های محیطی می شود که محصولات برخی از این ژن ها در محافظت از گیاه شرکت کرده و موجب حفظ ساختار سلولی می شوند (Bartels and Sunkars, 2005). فاکتورهای رونویسی، پروتئین های متصل شونده به توالی های خاصی از DNA هستند که قادر به فعال یا سرکوب کردن رونویسی ژن ها می باشند، بنابراین در تمامی موجودات زنده وجود دارند (Nimwegen, 2006; Arab et al., 2020). بسته به نوع عامل رونویسی، بعد از اتصال عامل رونویسی به نواحی مرتبط در ژن های تحت کنترل، بیان آنها کم یا زیاد می شود و مکانیسم های متفاوتی برای تنظیم بیان ژن دارند. بسیاری از خانواده های عوامل رونویسی در پاسخ به تنش های محیطی نقش دارند، بنابراین می توانند موجب غلبه گیاهان بر تنش های موجود از جمله خشکی گردند (Rahaie et al., 2012). در گیاهان یک عامل رونویسی مشخص شده است، که می تواند بسیاری از ژن ها را از طریق اتصال اختصاصی به عنصر cis-acting در ناحیه پروموتور ژن های هدف، کنترل کند (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2005). خانواده *bZIP* یکی از مهم ترین عوامل رونویسی است که در بیشتر تنش ها دخیل هستند و در رونویسی تعداد زیادی از ژن های پاسخ دهنده به تنش ها

(*et al.*, 2010). لذا این پژوهش به منظور بررسی الگوی بیان ژن‌های *WRKY1*، *HMA2* و *ZIP1* در شرایط تنش خشکی و محلول‌پاشی نانو اکسید روی در ارقام گندم انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در سال ۱۳۹۸ در گلخانه تحقیقاتی گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه محقق اردبیلی انجام شد. مشخصات خاک آزمایش شامل $pH = 6.48$ ، $EC = 2.4$ دسی‌زیمنس بر متر، N ، P ، K و Zn به ترتیب $1/68$ ، $19/8$ ، 212 و $0/28$ میلی‌گرم بر کیلوگرم و بافت خاک لومی-شنی بود. برای اعمال سطوح مختلف تنش پس از تعیین وزن خشک خاک در سه گلدان آزمایشی به آرامی و تا حد اشباع به آن آب اضافه شد و پس از خارج شدن کامل آب ثقیلی، گلدان توزین شد. در نهایت، پس از کسر وزن گلدان و خاک خشک مقدار آب نگهداری شده در FC (ظرفیت زراعی) تعیین شد (*Hosseinzadeh et al.*, 2016). این آزمایش گلدانی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد. فاکتور اول تنش خشکی در سه سطح (۳۵، ۶۰ و ۸۵ درصد ظرفیت زراعی)، فاکتور دوم ارقام گندم شامل سه رقم حیدری (متحمل) و میهن (نیمه‌متحمل) و سای‌سونز (حساس) و فاکتور سوم محلول‌پاشی نانو اکسید روی در سه سطح (صفر، $0/5$ و 1 گرم بر لیتر) بود. بذور مورد نظر از مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه گردید. محلول‌پاشی با نانو اکسید روی در مرحله سه برگی اعمال شده و سه روز بعد از محلول‌پاشی، تنش خشکی به مدت ده روز بر اساس ظرفیت زراعی به گلدان‌ها اعمال گردید سپس نمونه‌برداری از نمونه‌های شاهد و تیماری جهت بررسی بیان ژن‌های *WRKY1*، *HMA2* و *ZIP1* انجام گرفت. پس از جمع‌آوری نمونه‌ها، بلافاصله در نیتروژن مایع قرار گرفتند و تا مرحله استخراج RNA کل، در دمای $-80^{\circ}C$ نگهداری شدند.

طراحی آغازگرها: برای طراحی آغازگرها از دو برنامه آنالیز Primer3 و DNA Integrate Technology استفاده شد و تحت نرم‌افزار راهبردی Geneious IR9 قرار گرفت.

دخالت دارند (*Hwang et al.*, 2014). با توجه به نقش کلیدی پروتئین‌های *ZIP* در جذب آهن و روی در گیاهان، پیشرفت‌های چشم‌گیری در همسانه‌سازی و توصیف عملکرد آن‌ها در گیاهان زراعی مانند گندم به دست آمده است (*Durmaz et al.*, 2011). یکی دیگر از خانواده‌های عوامل رونویسی، خانواده *WRKY* است که بارزترین نقش را در پاسخ به تنش‌ها دارند. این خانواده جزء ۱۰ خانواده بزرگ ژنی در گیاهان عالی می‌باشند که مانند دیگر خانواده‌های ژنی گیاهی، طی تکامل گیاهان گسترش یافته‌اند و در مقاومت به تنش‌های غیرزیستی و همچنین مراحل نمو نقش گسترده‌ای دارند (*Rushton et al.*, 2010). نقش تنظیمی بعضی از عوامل رونویسی *WRKY* و *MYB93* در تحمل گیاهان به تنش خشکی مشخص گردیده است (*Niu et al.*, 2012; *Arab et al.*, 2020). محققان تجزیه بیان ژن‌های عوامل رونویسی (*WRKY* و *bZIP*) را در دو ژنوتیپ گندم مقاوم و حساس به تنش شوری مورد بررسی قرار دادند و مشاهده نمودند که تغییر میزان بیان ژن‌ها در رقم مقاوم بیشتر از رقم حساس است (*Rahaie et al.*, 2012). در عین حال، گزارشهایی از اهمیت ژن *HMA* در القاء تحمل نسبت به تنش اکسیداتیو ناشی از شرایط تنش‌های محیطی ارائه شده است (*Navabpour et al.*, 2003). تاکاهاشی و همکاران (*Takahashi et al.*, 2012) گزارش کردند که غلظت روی با خاموشی ژن *OshMA2* در برگ‌های برنج کاهش، ولی در ریشه افزایش می‌یابد. با توجه به اهمیت عوامل رونویسی، بررسی بیان آن‌ها در شرایط تنش خشکی و فعال شدن سیستم آنتی‌اکسیدانی توسط نانو اکسید روی می‌تواند با ارزش باشد، تا اطلاعات حاصل از آن در راستای اصلاح و انتخاب گیاهان مقاوم به تنش خشکی مورد استفاده قرار گیرد. زیرا مطالعات مختلف نشان داده‌اند که عوامل رونویسی (مانند *bZIP*، *bHLH*، *WRKY* و عناصر دخیل در انتقال پیام مانند پروتئین کینازهای وابسته به کلسیم کینازها) در کنترل تنظیم میزان بیان بسیاری از پروتئین‌های عملکردی نقش دارند و از مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های کنترل ژن‌ها می‌باشند (*Rushton*

تمامی نکات مربوط به طراحی آغازگر از قبیل درصد GC بالای ۵۰ درصد و حضور G و یا C در انتهای 3' آغازگرها، دمای اتصال ۶۰ درجه و طراحی آغازگر از ناحیه 3' ژن مورد توجه قرار گرفت. بر این اساس دو جفت آغازگر برای ژنهای مورد نظر طراحی و از ژن مرجع *18s rRNA* به منظور نرمال سازی داده استفاده شد.

استخراج RNA و ساخت cDNA: از بافت برگ با سه تکرار زیستی نمونه برداری انجام شد. نمونه ها به ازت مایع منتقل و در ادامه استخراج RNA با استفاده از کیت استخراج و دستور شرکت (Vivantis، تایوان) انجام شد. RNA استخراج شده با آنزیم DNaseI (فرمتاز، USA) تیمار شد و بعد از اتمام تیمار با DNase جهت تعیین کمیت نمونه های RNA به روش اسپکتروفتومتری از دستگاه نانودراپ (مدل ۲۰۰۰c، شرکت ترموساینتیفیک) استفاده شد. به منظور تأیید کیفیت RNA استخراج شده از آگارز ۱/۵ درصد استفاده گردید. سپس ۵۰۰ نانوگرم از RNA کل برگ ها برای سنتز رشته cDNA به کار برده شد. برای ساخت cDNA از کیت RevertAid™ First Strand Synthesis K1622 شرکت فرمتاز و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. بعد از ساخت cDNA، به منظور نگهداری، نمونه ها به فریزر ۲۰- منتقل و برای اطمینان از ساخت cDNA با استفاده از ژن مرجع

18s rRNA واکنش زنجیره ای پلی مرز بر روی همه cDNA های ساخته شده انجام شد. عملیات بهینه تکثیر در دستگاه Real-time PCR مدل StepOne شرکت اپلاید بایوسیستم انجام گرفت. برنامه واکنش شامل: مرحله واسرشت اولیه ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۲۰ ثانیه، مرحله واسرشت ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال ۵۸ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله بسط ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه بود. الگویابی منحنی ذوب از ۶۰ درجه سانتی گراد تا ۹۵ درجه در پایان واکنش برای هر PCR جهت تشخیص اختصاصی بودن واکنش انجام گرفت.

تجزیه و تحلیل داده ها: به منظور بررسی نرمال بودن داده ها و اشتباهات آزمایشی از نرم افزار MINITAB (نسخه ۱۹) و برای تجزیه واریانس از نرم افزار SAS (نسخه ۹/۴) و برای انجام مقایسات میانگین از روش LSD در سطح احتمال ۰/۵ استفاده شد. داده های مربوط به دستگاه Real-time PC بازدهی تمامی واکنش ها با استفاده از نرم افزار (Ruijter et al., 2009) LinReg محاسبه گردید. پس از محاسبه چرخه آستانه (Cycle of threshold, Ct)، مقدار بیان نسبی ژن های مورد مطالعه در گیاهان تیمار شده نسبت به شاهد با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد (Schmittgen and Livak, 2008).

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای مربوط به ژن های *ZIP1*، *HMA2*، *WRKY1* و ژن مرجع *18s rRNA*

Table 1. Characteristics of Primers Related to the *WRKY1*, *HMA2*, *ZIP1* Genes

شماره No.	نام ژن Gene name	نام آغازگر Primer name	توالی آغازگر (۵'-۳') Primer sequence (5'-3')	طول ناحیه تکثیر (جفت باز) Amplicon size (bp)	دمای اتصال (سانتی گراد) Annealing temperature (°C)
1	WRKY1 (EU665424.1)	WRKY1 F WRKY1 R	GCCCGTCATCCTCCATCAAT CCTGCCCATCATCTTGTTGGT	129	60
2	HMA2 (HM021132.1)	HMA2 F HMA2 R	GCATCCGCTTATTTGGGCAG CCACTGCCCTTTCTCCCTCAG	96	60
3	ZIP1 (AY864925.1)	ZIP1 F ZIP1 R	AGAGCTGGGAATCTTGGTGC AATGCAACCACCCAAGCCTA	139	60
4	18s rRNA (AH001810.2)	18srRNA F 18srRNA R	GGAGTATGGTGCAGAGGCTGAAAC CTCAATCTGTCAATCCTCACTATGTCTGG	133	61

نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول ۲) نشان داد اثرات متقابل رقم × تنش خشکی × نانوذره روی بر بیان نسبی ژن‌های *WRKY1*، *HMA2* و *ZIP1* در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار است. نتایج حاصل از بررسی بیان نسبی ژن *ZIP1* در برگ سه رقم میهن، حیدری و سای‌سونز تحت تنش خشکی و کاربرد نانوذره روی نشان داد که ژن *ZIP1* در ارقام مورد بررسی در شرایط کنترل، بیان قابل‌توجهی داشتند. با افزایش سطوح تنش خشکی بیان ژن *ZIP1* در رقم میهن افزایش پیدا کرد ولی میزان بیان این ژن در رقم سای‌سونز کاهش یافت. بیشترین مقدار بیان این ژن در رقم حیدری (۳۶۲۵۱ Fold change)، در تنش خشکی ملایم مشاهده گردید و کمترین میزان بیان این ژن (۲۸۴۰۳ Fold change) مربوط به همین رقم، تحت اثرات متقابل تنش خشکی شدید و نانوذره روی بود (شکل ۱). عامل رونویسی *bZIP* بیشترین تعداد ژن‌های کلیدی مربوط در پاسخ به تنش خشکی گیاه جو را در بین ژن‌های مؤثر دارد که نشان دهنده اهمیت این عامل رونویسی در مکانیسم تحمل به تنش خشکی است (Javadi et al., 2016). احتمالاً در رقم میهن افزایش بیان ژن *ZIP1* تحت تنش شدید (۳۵ درصد ظرفیت زراعی) و ملایم (۶۰ درصد ظرفیت زراعی) نسبت به شاهد (۸۵ درصد ظرفیت زراعی) نشان‌دهنده تأثیر مهم این عامل رونویسی در مکانیسم تحمل به تنش خشکی گندم می‌باشد. هرچند بیان بالای این ژن در برگ نشانگر نقش اساسی این فاکتور رونویسی در فعال‌سازی *ZIP*‌های دخیل در انتقال روی در داخل گیاه است (Mahmoudi Malhamlu and Abdollahi Mandoulakani, 2019). تعداد و نوع پروتئین‌های ناقل روی در گیاه، بسته به نوع رقم و وضعیت تغذیه روی متفاوت است (Pedas et al., 2009). دورماز و همکاران (Durmaz et al., 2011) مشاهده کردند که سطح بیان *ZIP1* در ارقام گندم متحمل به کمبود روی بیشتر از ارقام حساس به کمبود روی است. نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که ژن *ZIP1* در برگ هر سه رقم گندم بیان شد، اما سطح بیان این ژن در رقم حیدری بیشتر از دو رقم دیگر بود. در برنج گزارش شده است که بیان ژن *ZIP1* تحت شرایط کمبود روی

و روی کافی تا حدود بسیار کمی در پانیکول بیان می‌شود و با حذف روی از محیط کشت، میزان بیان این ژن شدیداً افزایش می‌یابد (Chen et al., 2008). نانوذره روی نسبت به تیمار شاهد (بدون محلول‌پاشی) (۲۹/۷۷۱ Fold change) میزان بیان ژن *ZIP1* را تحت تنش ملایم (در رقم میهن) و شدید (در رقم سای‌سونز) افزایش داد، که بیشترین میزان (۳۴/۳۳۰ Fold change) این افزایش بیان در غلظت ۰/۵ گرم بر لیتر اتفاق افتاد. در این راستا دورماز و همکاران (Durmaz et al., 2011) با بررسی الگوی بیان پروتئین *ZIP1* در اندام هوایی ارقام مختلف گندم در غلظت‌های مختلف روی مشاهده کردند که با کاهش غلظت روی، سطح رونویسی *ZIP1* در تمام ژنوتیپ‌ها افزایش یافت. که با نتایج تحقیق حاضر در رابطه با افزایش بیان این ژن در غلظت پایین نانوذره روی مطابقت داشت و همچنین بیان ژن *ZIP1* احتمالاً بیانگر دخالت فعال‌سازی ژن‌های *ZIP* کدکننده پروتئین‌های ترانسپورتر روی در گندم می‌باشد. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد تنش خشکی باعث افزایش بیان نسبی ژن *WRKY1* شد، به‌طوری‌که این افزایش بیان در رقم میهن بیشتر از سایر ارقام بود. بیشترین میزان بیان ژن *WRKY1* (۳۸/۸۵۲ Fold change) در تیمار تنش خشکی ۳۵ درصد ظرفیت زراعی در رقم میهن به‌دست آمد و کمترین میزان بیان این ژن (۲۸/۷۱۲ Fold change) مربوط به رقم حیدری در برهم‌کنش تنش ملایم با محلول‌پاشی ۰/۵ گرم در لیتر نانوذره روی بود. نانوذره روی در غلظت یک گرم در لیتر باعث افزایش بیان ژن *WRKY1* (۳۲/۶۸۸ Fold change) شد (شکل ۲). مطالعات متعدد نشان داده است که طی فرآیند پاسخ به تنش‌های غیرزیستی (مثل خشکی و شوری) در گیاهان، عوامل رونویسی *WRKY* به شدت و با سرعت زیاد بیان می‌شوند که این امر به‌دلیل عملکرد تنظیمی آن‌ها در این مسیر پیام‌رسانی است، که مقاومت به تنش را سبب می‌شود (Chen et al., 2012). این مطالعات با نتایج بدست آمده ما در این پژوهش در رابطه با افزایش بیان نسبی ژن *WRKY1* در ارقام مورد مطالعه تحت تنش خشکی مطابقت داشت. در صورتی‌که ژن‌هایی که در هر دو ژنوتیپ متحمل و حساس افزایش بیان نشان می‌دهند را می‌توان تنها پاسخی به تنش در نظر گرفت (Guo et al., 2009).

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس تأثیر تنش خشکی و نانوذره روی بر الگوی بیان برخی ژن‌ها در ارقام گندم

Table 2. Results of analysis of variance the effect of drought stress and zinc nanoparticles on the pattern of expression of some genes in wheat cultivars

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی D.F	میانگین مربعات Mean Squares		
		ZIP1	WRKY1	HMA2
رقم Cultivar	2	43.396**	108.340**	2.358**
تنش خشکی Drought stress	2	35.093**	3.573**	9.182**
نانوذره روی ZnO	2	18.122**	111.343**	6.764**
رقم × تنش خشکی Cultivar × drought stress	4	37.101**	9.681**	22.934**
رقم × نانوذره روی Cultivar × ZnO	4	12.275**	9.307**	4.436**
تنش خشکی × نانوذره روی Drought stress × ZnO	4	13.827**	4.780**	2.661**
اثرات متقابل سه جانبه Interactions tripartite	6	19.020**	6.451**	3.372**
خطا Error	47	0.433	0.241	0.319
ضریب تغییرات (%) Coefficient of variation	-	2.07	1.48	1.87

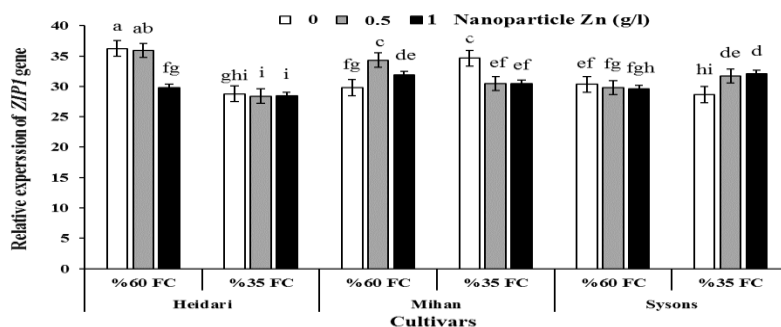
ns، * و **: به ترتیب عدم معنی‌داری و معنی‌داری در سطح احتمال پنج و یک درصد

ns, * and **: Nonsignificant and significant at 0.05 and 0.01 of probability level, respectively.

نسبی این ژن شد که نشان از واکنش متفاوت ارقام گندم نسبت به نانوذره روی دارد (شکل ۳). سینکلایر و همکاران (Sinclair et al., 2018) بیان کردند که افزایش بیان *HMA2* به احتمال زیاد در گیاهانی که تحت تنش کمبود روی و یا غلظت پایین روی هستند موجب افزایش بارگیری روی و انتقال به ساقه می‌شود. در پژوهش حاضر کاربرد نانوذره روی موجب افزایش بیان نسبی ژن *HMA2* در رقم سای سونز نسبت به دو رقم دیگر شد. از آن جایی که روی، قادر به انتشار بین غشای سلولی نیست، ترانسپورتهای ویژه برای انتقال روی به سیتوپلاسم مورد نیاز است (Taylor et al., 2004). در تحقیق حاضر افزایش بیان ژن *HMA2* در ارقام حیدری و سای سونز به عنوان ناقل بین سلولی (Hussain et al., 2004)، احتمالاً نشان دهنده انتقال روی به بافت‌های مصرف‌کننده روی و اثر تنظیم کنندگی روی در سلول‌ها (جهت تعدیل رادیکال‌های آزاد و آثار تخریبی آنها در سیستم‌های غشایی) بوده، که تحمل گیاهان را به تنش خشکی افزایش می‌دهند.

بنابراین در تحقیق حاضر افزایش بیان نسبی ژن *WRKY1* در رقم میهن (متحمل) و سای سونز (حساس) تحت تنش خشکی احتمالاً نشان‌دهنده پاسخ به تنش می‌باشد. پژوهشگران بیان داشتند که مصرف روی باعث افزایش تحمل گندم به شرایط تنش خشکی می‌گردد (Abbasi et al., 2016). بنابراین احتمالاً کاربرد نانوذره روی می‌تواند باعث افزایش بیان نسبی ژن *WRKY1* در جهت افزایش تحمل ارقام مورد مطالعه به تنش خشکی باشد.

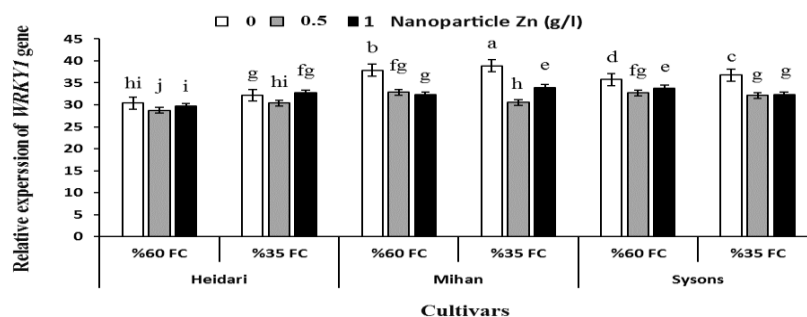
نتایج مقایسات میانگین نشان داد که بیان نسبی ژن *HMA2* تحت تأثیر تیمارهای آزمایش قرار گرفته است. بیان ژن *HMA2* در رقم حیدری تحت تنش شدید خشکی در مقایسه با شرایط شاهد، کاهش معنی‌داری نشان داد ولی ارقام میهن و سای سونز چندان تحت تأثیر قرار نگرفتند. بیشترین میزان بیان نسبی ژن *HMA2* مربوط به رقم حیدری (۳۳/۴۸۷ Fold change) تحت تنش خشکی ملایم بود. نانوذره روی در رقم سای سونز باعث افزایش بیان ژن *HMA2* نسبت به شاهد و در رقم میهن باعث کاهش بیان



شکل ۱- مقایسه میانگین اثر متقابل تنش خشکی و نانوذره روی بر بیان نسبی ژن *ZIP1* در ارقام گندم.

Figure 1. Mean comparison the interaction of drought stress and zinc nanoparticle on the relative expression of *ZIP1* gene in wheat cultivars

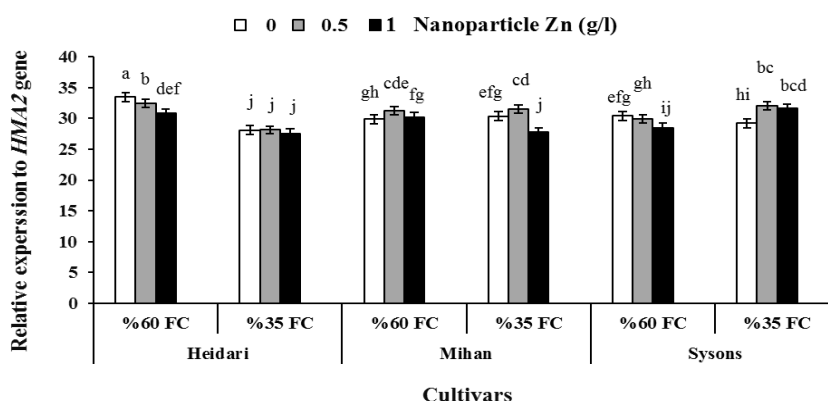
واحد بیان ژن Fold change است. ستون‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، اختلاف معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۰/۰۵ ندارند. Unit of gene expression is fold change. Columns with at least one common letter have not significant difference based on the LSD test at a probability level of 0.05



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل تنش خشکی و نانوذره روی بر بیان نسبی ژن *WRKY1* در ارقام گندم

Figure 2. Mean comparison the interaction of drought stress and zinc nanoparticle on the relative expression of *WRKY1* gene in wheat cultivars

واحد بیان ژن Fold change است. ستون‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، اختلاف معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۰/۰۵ ندارند. Unit of gene expression is fold change. Columns with at least one common letter have not significant difference based on the LSD test at a probability level of 0.05



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل تنش خشکی و نانوذره روی بر بیان نسبی ژن *HMA2* در ارقام گندم

Figure 3. Mean comparison the interaction of drought stress and zinc nanoparticle on the relative expression of *HMA2* gene in wheat cultivars

واحد بیان ژن Fold change است. ستون‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، اختلاف معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۰/۰۵ ندارند. Unit of gene expression is fold change. Columns with at least one common letter have not significant difference based on the LSD test at a probability level of 0.05

تحمل گیاه به خشکی دخالت دارند. همچنین کاربرد نانوذره روی در غلظت‌های ۰/۵ و ۱ گرم در لیتر باعث افزایش میزان بیان ژن ZIP1 و ژن HMA2 در رقم سای سونز (به‌عنوان ژن‌های کد کننده پروتئین‌های ترانسپورتر روی در گندم) نشان دهنده اثر تنظیم کنندگی روی در سلول‌ها بوده که با کاهش اثرات رادیکال‌های آزاد تولید شده، موجب افزایش تحمل گیاه به تنش خشکی می‌شوند.

به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که افزایش بیان نسبی عوامل رونویسی WRKY1، HMA2 و ZIP1 تحت تنش در رقم میهن، منجر به رونویسی از ژن‌های رمزکننده پروتئین‌های عملکردی شده و نهایتاً با تولید این ترکیبات گیاه شرایط کم‌آبی را تحمل می‌کند. به‌عبارتی تغییر بیان ژن‌های مورد مطالعه تحت شرایط خشکی نشان دهنده این می‌باشد که این ژن‌ها، احتمالاً در مسیرهای حفاظتی و

References

- Abbasi, A., Shekari, F., Mousavi, S.B. and Sabaghnia, N. (2016). Assessment of the effect of zinc sulfate biofortification on the quantity and quality characteristics of spring wheat cultivars. *Advances in Bioresearch*, 7(1): 18-25 (In Persian).
- Arab, K., Ravash, R. and Shiran, B. (2020). Evaluation of MYB93 and MAD8 genes in transgenic and non-transgenic rice. *Plant Genetic Researches*, 6(2): 33-42 (In Persian).
- Bartels, D. and Sunkar, R. (2005). Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24: 23-58.
- Cakmak, I. (2008). Enrichment of cereal grains with zinc: agronomic or genetic bio fortification? *Plant and Soil*, 302: 1-17.
- Chen, W.R., Feng, Y. and Chao, Y.E. (2008). Genomic analysis and expression pattern of OsZIP1, OsZIP3, and OsZIP4 in two rice (*Oryza sativa* L.) genotypes with different zinc efficiency. *Russian Journal of Plant Physiology*, 55(3): 400-409.
- Chen, L., Song, Y., Li, S., Zhang, L., Zou, C. and Yu, D. (2012). The role of WRKY transcription factors in plant abiotic stresses. *Biochimica Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 18: 120-128.
- Davoodi, M.A., Towfighi, J. and Rashidi, A. (2013). Facile synthesis of carbon nanotube/nanofiber paper on a water-soluble support in one-step by chemical vapor deposition. *Chemical Engineering Journal*, 221: 159-165 (In Persian).
- Durmaz, E., Coruh, C., Dinler, G., Grusak, M.A., Peleg, Z., Saranga, Y. and Budak, H. (2011). Expression and cellular localization of ZIP1 transporter under zinc deficiency in wild emmer wheat. *Plant Molecular Biology Reporter*, 29: 582-596.
- Guo, P., Baum, M., Grando, S., Ceccarelli, S., Bai, G., Li, R., Von Korff, M., Varshney, R.K., Graner, A. and Valkoun, J. (2009). Differentially expressed genes between drought-tolerant and drought-sensitive barley genotypes in response to drought stress during the reproductive stage. *Journal of Experimental Botany*, 60: 3531-3544.
- Hosseinzaadeh, S.R., Amiri, H. and Ismaili, A. (2016). Effect of vermicompost fertilizer on photosynthetic characteristics of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under drought stress. *Photosynthetica*, 54: 87-92 (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: 194-202.
- Hussain, D., Haydon, M.J., Wang, Y., Wong, E., Sherson, S.M., Young, J., Camakaris, J., Harper, J.F. and Cobbett, C.S. (2004). P-type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in Arabidopsis. *Plant Cell*, 16(5): 1327-1339.
- Javadi, S.M., Shabr, Z.S., Pour Abed, A. and Ghadiri, S. (2016). Reconstruction and analysis of drought tolerance gene networks in *Hordeum vulgare* leaf. *The First International Conference and the 9th National Biotechnology Conference of the Islamic Republic of Iran*. May 3rd to 5th, Tehran, Iran.
- Khoshgoftarmanesh, A.H., Schulin, R., Chaney, R.L., Daneshbakhsh, B. and Afyuni, M. (2010). Micronutrient-efficient genotypes for crop yield and nutritional quality in sustainable agriculture. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 30: 83-107 (In Persian).
- Karim, M.R. and Rahman, M.A. (2015). Drought risk management for increased cereal production in Asian Least Developed Countries. *Weather and Climate Extremes*, 7: 24-35 (In Persian).

- Karami, S., Modarres-Sanavy, M., Ghanehpour, S. and Keshavarz, H.** (2016). Effect of foliar zinc application on yield and, physiological traits and seed vigor of two soybean cultivars under water deficit. *Nebulae Sciatica Biological*, **8**: 181-191 (In Persian).
- Mahmoudi Malhamlu, F. and Abdollahi Mandoulakani, B.** (2019). Enhanced expression of superoxide dismutase, phenylalanine ammonialyase and bZIP33 transcription factor encoding genes under Zn deficiency conditions in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Cereal Research*, **9(1)**: 17-26.
- Niu, C.F., Wei, W.E.I., Zhou, Q.Y., Tian, A.G., Hao, Y.J., Zhang, W.K. and Chen, S.Y.** (2012). Wheat WRKY genes TaWRKY2 and TaWRKY19 regulate abiotic stresses tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Cell and Environment*, **35**: 1156-1170.
- Navabpour, S., Morris, K., Allen, R., Harrison, E., Mackerness, S. and Buchanan- Wollaston, V.** (2003). Expression of senescence -enhanced genes in response to oxidative stress. *Experimental Botany*, **54**: 2285-2292.
- Nimwegen, E.** (2006). *Scaling Laws in the Functional Content of Genomes*. Springer, Boston, USA.
- 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.
- Pask, A., Joshi, A.K., Manes, Y., Sharma, I., Chatrath, R., Singh, G.P., Sohu, V.S., Mavi, G.S., Sakuru, V.S.P., Kalappanavar, I.K., Mishra, V.K., Arun, B., Mujahid, M.Y., Hussain, M., Gautam, N.R., Barma, N.C.D., Hakim, A., Hoppitt, W., Trethowan, R. and Reynolds, M.P.** (2014). A wheat phenotyping network to incorporate physiological traits for climate change in South Asia. *Field Crops Research*, **168**: 156-167.
- Pedas, P., Schjoerring, J.K. and Husted, S.** (2009). Identification and characterization of zincstarvation-induced ZIP transporters from barley roots. *Plant Physiology and Biochemistry*, **47(5)**: 377-383.
- Paygzar, Y., Ghanbari, A., Heidari, M. and Tavassoli, A.** (2009). Effect foliar of micronutrients on the quantitative and qualitative characteristics of millet under drought stress (*Pennisetumglacum*) species notrified. *Iranian Journal of Agriculture Science, Islamic Azad University of Tabriz*, **3**: 67-78 (In Persian).
- Poormohammad Kiani, S., Maury, P., Nouri, L., Ykhlef, N., Grieu, P. and Sarrafi, A.** (2009). QTL analysis of yield related traits in sunflower under different water treatments. *Plant Breeding*, **128**: 363-373 (In Persian).
- Rahaie, M., Gomarian, M., Alizadeh, H., Malboobi, M.A. and Naghavi, M.R.** (2012). The expression analysis of transcription factors under long term salt stress in tolerant and susceptible wheat genotypes using reverse northern blot technique. *Iranian Journal of Crop Sciences*, **13**: 580-595 (In Persian).
- Rebey, I.B., Jabri-Karoui, I., Hamrouni-Sellami, I., Bourgou, S., Limam, F. and Marzouk, B.** (2012). Effect of drought on the biochemical composition and antioxidant activities of cumin (*Cuminum cyminum* L.) seeds. *Industrial Crops and Products*, **36**: 238-245.
- Rushton, P.J., Somssich, I.E., Ringler, P. and Shen, Q.J.** (2010). WRKY transcription factors. *Trends in Plant Science*, **15**: 247-258.
- Ruijter, J.M., Ramakers, C., Hoogaars, W.M.H., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M.J.B. and Moorman, A.F.M.** (2009). Amplification efficiency: Linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Research*, **37(6)**: e45.
- 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. *Plant Cell*, **30**: 2463-2479.
- Schmittgen, T.D. and Livak, K.J.** (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, **3**: 1101-1108.
- Takahashi, R., Bashir, K., Ishimaru, Y., Nishizawa, N.K. and Nakanishi, H.** (2012). The role of heavy-metal ATPases, HMAs, in zinc and cadmium transport in rice. *Plant Signaling and Behavior*, **7(12)**: 1605-1607.
- Taylor, K.M., Morgan, H.E., Johnson, A. and Nicholson, R.I.** (2004). Structure-function analysis of HKE4, a member of the new LIV-1 subfamily of zinc transporters. *Biochemical Journal*, **377(1)**: 131-139.
- Vishwakarma, M.K., Mishra, V.K., Gupta, P.K., Yadav, P.S., Kumar, H. and Joshi, A.K.** (2014). Introgression of the high grain protein gene Gpc-B1 in an elite wheat variety of indo-gangetic plains through marker assisted backcross breeding. *Current Plant Biology*, **1**: 60-67.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K.** (2005). Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic-and cold-stress-responsive promoters. *Trends in Plant Science*, **10**: 88-94.

Study of Expression Pattern of Some Transcription Factors in Wheat under Drought Stress and Zinc Nanoparticles

Seyede Yalda Raeesi Sadati¹, Sodabeh Jahanbakhsh Godehkahriz^{2,*}, Ali Ebadi³ and Mohammad Sedghi³

1- Ph.D. Student, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

2- Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

3- Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

(Received: June 24, 2020 – Accepted: January 18, 2021)

Abstract

Under drought stress condition, the signaling system induces expression of certain genes to counteract the deleterious effects of environmental stress. Among the essential micronutrients for plant growth and development, zinc has an important role in many plant metabolic processes including gene expression and stress tolerance. In order to investigate the effect of drought stress and ZnO on relative expression pattern of some genes involved in abiotic stresses (including *WRKY1*, *HMA2* and *ZIP1* genes) in wheat cultivars, a factorial experimental was conducted in pot condition based on a completely randomized design with three replications. In this experiment, the first factor was three levels of drought stress (35, 60 and 85% of field capacity), the second factor was three wheat cultivars (including Heidari, Meihan and Sysons), and the third factor was three levels of ZnO (0, 0.5 and 1 g/l⁻¹). According to the results, with increasing the level of drought stress, the relative expression of *WRKY1* and *ZIP1* genes in drought tolerant cultivar (Meihan), and also with increasing nanoparticle concentration over stress time, the expression of *ZIP1* gene in drought sensitive cultivar (Sysons) increased. The highest relative expression of *HMA2* gene was observed in Heidari cultivar under mild drought stress. Generally, the expression of all three genes studied in tolerant cultivar (Meihan) increased under drought stress. Increasing the expression level of *HMA2* and *ZIP1* genes could be related to the transfer of zinc to consuming tissues and also, to increase the consumption of zinc in current metabolism of plant, which is important in tolerance of wheat to drought stress.

Keywords: Gene expression, Drought stress, Transcription factors, Wheat, Zinc nanoparticle

* Corresponding Author, E-mail: jahanbakhsh@uma.ac.ir