

تحقیقات غلات

دوره هشتم / شماره سوم / پاییز ۱۳۹۷ (۳۴۵-۳۵۸)

مطالعه بیان ژن‌های *ZIP1*، *ZIP3* و *ZIP6* در گندم نان تحت شرایط کمبود روی

سیدمحسن نیازخانی^۱، بابک عبدالهی مندولکانی^{۲*}، مراد جعفری^۳ و میرحسن رسولی صدقیانی^۴

تاریخ دریافت: ۹۷/۵/۵

تاریخ پذیرش: ۹۷/۷/۵

چکیده

کمبود روی (Zn) در خاک، عملکرد گیاه و محتوای روی دانه را کاهش می‌دهد. تنظیم بیان ژن‌های خانواده *ZIP* (*ZRT/IRT-like protein*)، یکی از مکانیسم‌های عمده گیاهان برای مقابله با تنش کمبود روی است. به منظور مطالعه بیان ژن‌های *ZIP1*، *ZIP3* و *ZIP6* در برگ و ریشه ارقام گندم روی-کارا و روی-ناکارا تحت شرایط کمبود روی، آزمایشی به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد. ارقام بیات و نیک‌نژاد (روی-کارا) و هیرمند و کرج ۱ (روی-ناکارا) در شرایط کفایت روی و کمبود آن کشت و بیان نسبی این ژن‌ها در ریشه و برگ در دو مرحله رشدی، ۲۸ روز بعد از جوانه‌زنی (رویشی) و ۳۰ درصد سنبله‌دهی (زایشی)، اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که میزان بیان نسبی هر سه ژن تحت شرایط کمبود روی در ارقام روی-کارا به طور معنی‌داری ($P \leq 0.01$) بیش‌تر از ارقام روی-ناکارا افزایش یافت. بیان نسبی ژن *ZIP1* در مراحل رویشی و زایشی در ریشه به طور معنی‌داری ($P \leq 0.01$) بیش‌تر از برگ بود، در حالی که ژن‌های *ZIP3* و *ZIP6* هم در ریشه و هم در برگ بیان شدند. تجزیه همبستگی بیان ژن‌ها و محتوای Zn دانه نشان داد که همبستگی مثبت و معنی‌داری ($P \leq 0.05$) بین بیان ژن *ZIP6* در برگ در مرحله زایشی و محتوای Zn دانه گندم وجود دارد. به طور کلی، افزایش بیان ژن *ZIP1* در ریشه و ژن‌های *ZIP3* و *ZIP6* در ریشه و برگ در این تحقیق نشان داد که احتمالاً ژن *ZIP1* عمدتاً در جذب روی از خاک و ژن‌های *ZIP3* و *ZIP6* در جذب و انتقال روی به اندام‌های هوایی در گندم نان دخالت دارند.

واژه‌های کلیدی: ژن‌های ترانسپورتر روی، محتوای روی دانه، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در زمان واقعی

۱- دانشجوی دکتری، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲- دانشیار، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۳- دانشیار، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۴- استاد، گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

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

مقدمه

گندم قسمت بیش‌تر پروتئین، املاح و ویتامین‌های گروه B را تأمین می‌کند (Halim *et al.*, 2018). این گیاه دارای گونه‌های متعددی است، اما بیش‌ترین سطح زیر کشت (۹۰ درصد) و بیش‌ترین میزان تولید (۹۴ درصد) مربوط به گندم نان (*Triticum aestivum* L.) است (Emam, 2013). گندم نیز همانند سایر گیاهان زراعی در طول دوره رشد با محدودیت‌های محیطی متعددی مانند کمبود عناصر روی (Zn) و آهن مواجه می‌شود (Abdoli and Esfandiari, 2014). از بین عناصر کم‌مصرف، کمبود روی مهم‌ترین عامل محدود کننده است و تقریباً نصف خاک‌های زیر کشت غلات در دنیا به ویژه خاک‌های آهکی مناطق خشک و نیمه‌خشک دچار کمبود Zn هستند (Cakmak *et al.*, 2002). به دلیل کمبود این عناصر در خاک‌های زراعی، توجه به نقش عناصر کم‌مصرف از جمله روی در غلات افزایش قابل توجهی طی دهه گذشته داشته است (Sadeghzadeh, 2015). برای حل مشکل کمبود Zn در گیاهان، از استراتژی‌های متفاوتی استفاده شده است (Pandey *et al.*, 2012). از جمله راهکارهای امیدوار کننده، استفاده از ژنوتیپ‌های روی-کارا (Zn-efficient) می‌باشد که قادرند تحت شرایط کمبود Zn خاک، به‌طور مؤثری Zn خاک را جذب و عملکرد بیش‌تری تولید کنند (Graham *et al.*, 1992; Rengel, 2001). این ژنوتیپ‌ها نه تنها قادرند عملکرد قابل قبولی تحت شرایط کمبود Zn تولید کنند، بلکه باعث کاهش ورود کودهای اضافی به خاک می‌شوند و به‌طور مؤثری از محیط زیست حفاظت می‌کنند (Rengel, 2001).

گزارش‌های متعددی مبنی بر وجود تنوع ژنتیکی برای روی-کارایی (Zn efficiency) در داخل و بین گونه‌های گیاهی وجود دارد (Graham and Rengel, 1993; Kalayci *et al.*, 1999). یکی از دلایل تفاوت در توانایی گیاهان مختلف در جذب روی، ممکن است مربوط به اختلاف آن‌ها در تعداد و نوع پروتئین‌های ناقل روی در ریشه باشد (Ghasemi *et al.*, 2015). از آنجایی که Zn قادر به انتشار بین غشای سلولی نیست، ترانسپورتهای ویژه برای انتقال Zn به سیتوپلاسم مورد نیاز است (Kambe *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2004). در سال‌های اخیر، تعدادی از ناقل‌های عناصر فلزی که در جذب و توزیع Zn در گیاهان دخالت دارند، شناسایی شده‌اند (Durmaz *et al.*, 2011). اعضای ژن‌های خانواده ZIP (-ZRT/IRT-

(Like Proteins) کاندیدهای مناسبی برای تسهیل ورود Zn به سیتوزول و جذب آن از خاک و تخلیه Zn از آوند چوبی هستند (Assunção *et al.*, 2001). تعداد و نوع پروتئین‌های ناقل Zn در گیاه، بسته به نوع رقم و وضعیت تغذیه روی متفاوت است (Pedas *et al.*, 2009). در شرایط کمبود Zn، انواع مختلفی از ژن‌های خانواده ZIP در ریشه و برگ گیاهان بیان و باعث افزایش تحمل گیاه به کمبود Zn می‌شود (Durmaz *et al.*, 2011). با توجه به نقش کلیدی پروتئین‌های ZIP در جذب آهن و Zn در گیاهان، پیشرفت‌های چشمگیری در همسانه‌سازی و توصیف عملکرد آن‌ها در گیاهان زراعی مانند برنج (Ramesh *et al.*, 2003; Ishimaru *et al.*, 2005, 2007; Chen *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2010a, b), ذرت (Tiong *et al.*, 2014, 2015), لوبیا (Astudillo *et al.*, 2013), سویا (Moreau *et al.*, 2002) و گندم تتراپلوئید (Durmaz *et al.*, 2011) به دست آمده است. با این حال، با توجه به اهمیت بسیار زیاد گندم نان در تأمین انرژی روزانه انسان‌ها، به نظر می‌رسد که مطالعه جامعی در مورد ژن‌های ZIP در این محصول استراتژیک انجام نگرفته است. به همین جهت، با توجه به نقش پروتئین‌های ZIP در کارایی ارقام نسبت به جذب Zn، مطالعه بیان ژن‌های کدکننده این پروتئین‌ها در ارقام گندم نان روی-کارا و روی-ناکارا می‌تواند در اصلاح ارقام روی-کارا در این محصول با ارزش موثر باشد. بنابراین هدف از تحقیق حاضر، مطالعه الگوی بیان برخی ژن‌های ZIP در برگ و ریشه ارقام گندم نان با روی-کارایی متفاوت در مراحل مختلف رشدی تحت شرایط کمبود روی بود.

مواد و روش‌ها

این تحقیق به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در بهار و تابستان سال ۱۳۹۶ در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه اجرا شد. فاکتور اول شامل روی (Zn) در دو سطح صفر (کمبود Zn) و پنج میلی‌گرم در کیلوگرم (Zn کافی) از منبع سولفات روی ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) بود که سطح دوم به تیمارهای دارای Zn اضافه شد. فاکتور دوم، ارقام گندم با روی-کارایی متفاوت شامل دو رقم بیات و نیک‌نژاد به‌عنوان ارقام روی-کارا و دو رقم هیرمند و کرج ۱ به‌عنوان ارقام روی-ناکارا بود (Khoshgoftarmansh *et al.*, 2009; Baghban-Tabiat and Rasouli-Sadaghiani, 2012). فاکتور سوم

این آزمایش، اندام‌های ریشه و برگ و فاکتور چهارم نیز دو مرحله نمونه‌برداری شامل ۲۸ روز بعد از جوانه‌زنی (رویشی) و ۳۰ درصد سنبله‌دهی (زایشی) بود.

خاک استفاده شده در این تحقیق بعد از تهیه از بستر شنی رودخانه فصلی "خان آرخی" ارومیه، با مقدار Zn بسیار کم (جدول ۱)، ابتدا با الک دو میلی‌متری غربال و

سپس پنج بار با آب معمولی شسته و در نهایت با آب دوبار تقطیر، آب‌کشی و هواخشک شد. مواد غذایی مورد نیاز (جدول ۲) به‌صورت محلول در آب دوبار تقطیر تهیه و قبل از کشت با آب‌پاش به خاک تک‌تک گلدان‌ها اضافه و کاملاً با آن مخلوط شد (Baghban-Tabiat and Rasouli- Sadaghiani, 2012).

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

Table 1. Physical and chemical properties of the sandy soil used in the current investigation

| Sand (%) | Silt (%) | Clay (%) | Zn (ppm) | K (ppm) | P (ppm) | N (%) | Organic matter (%) | CaCo3 (%) | pH | Ec (mmoh/cm) |
|----------|----------|----------|----------|---------|---------|-------|--------------------|-----------|-----|--------------|
| 96 | 1 | 3 | 0.15 | 9.4 | 2.5 | 0.61 | 0.69 | 9 | 7.8 | 1.19 |

جدول ۲- ترکیب محلول غذایی مورد استفاده در آزمایش

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

| Amount (ml/kg) | Concentration (gr/L) | Ingredients |
|----------------|------------------------------|---|
| (3) | (48.407)/(30.242) | K ₂ SO ₄ / KH ₂ PO ₄ |
| (1) | (147.016)/(93) | NH ₄ NO ₃ /CaCl ₂ .2H ₂ O |
| (1) | (20.5) | MgSO ₄ .7H ₂ O |
| (2) | (0.333)/(1.05)/(0.083)/(7.5) | MnSO ₄ .H ₂ O/Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O/CuSO ₄ .5H ₂ O/H ₃ BO ₃ |
| (1.67) | (13.14) | ZnSO ₄ .7H ₂ O |

نمونه‌ها در کوره الکتریکی و قرائت مقدار Zn عصاره استخراجی توسط دستگاه جذب اتمی (مدل Shimadzu AA-6300) انجام شد. محتوای Zn دانه از طریق فرمول "غلظت Zn دانه × وزن خشک دانه" و همچنین شاخص روی-کارایی برای هر یک از ارقام محاسبه شد (Baghban-Tabiat and Rasouli-Sadaghiani, 2012).

برای مطالعه بیان ژن ابتدا توالی ژن‌های ZIP3، ZIP1 و ZIP6 از پایگاه اطلاعاتی NCBI ذخیره و آغازگرهای اختصاصی با استفاده از نرم‌افزارهای FastPCR و GeneRunner طراحی شد (جدول ۳). استخراج RNA از ریشه و برگ نمونه‌های گیاهی با استفاده از محلول استخراج RNX-plusTM (سیناکلون، ایران) مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده با اعمال اندکی تغییرات انجام شد. برای ارزیابی کیفیت و کمیت RNA از نانودراپ و الکتروفورز ژل آگارز یک درصد استفاده شد. قبل از سنتز cDNA، حذف DNA ژنومی از نمونه‌های استخراجی با استفاده از تیمار DNase انجام گرفت. سنتز cDNA با استفاده از کیت First Aid Revert Synthesis cDNA Strand (فرمنتاز، آلمان) مطابق با دستورالعمل پیشنهادی شرکت سازنده انجام شد. به‌منظور اطمینان از عدم وجود آلودگی DNA ژنومی و اجزای واکنش و صحت ساخت cDNA، دو واکنش

علاوه بر این مواد غذایی، Zn از منبع ZnSO₄.7H₂O به خاک تیمارهای با Zn کافی افزوده شد. تعداد ده عدد بذر گندم از هر یک از ارقام بعد از ضدعفونی با الکل ۷۰ درصد و آب ژاول در هر یک از گلدان‌های پلی‌اتیلنی به قطر ۱۱ و ارتفاع ۳۴ سانتی‌متر حاوی چهار کیلوگرم خاک کشت و بعد از ده روز به هفت عدد کاهش داده شد. در طول فصل، آبیاری با استفاده از آب دوبار تقطیر در حد ظرفیت زراعی انجام گرفت. در طول دوره رشد، به‌منظور جلوگیری از کمبود نیتروژن، هر دو هفته یک‌بار به گلدان‌ها محلول نترات آمونیوم اضافه شد. نمونه‌برداری در دو مرحله ۲۸ روز بعد از جوانه‌زنی (رویشی) و ۳۰ درصد سنبله‌دهی (زایشی) از ریشه و برگ گیاهان انجام و مقداری از نمونه‌ها با استفاده از ازت مایع جهت انجام آزمایش‌های بیان ژن به یخچال ۸۰- درجه سلسیوس منتقل شد. بخشی از نمونه‌ها نیز جهت تعیین غلظت Zn به آزمایشگاه علوم خاک دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه انتقال داده شد. برای اندازه‌گیری Zn، نمونه‌های گیاهی در پاکت‌های کاغذی به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۶۸ درجه سلسیوس در دستگاه خشک‌کن قرار گرفتند و بعد از اندازه‌گیری وزن خشک، نمونه‌ها توسط آسیاب پودر و غلظت Zn آن‌ها اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری غلظت Zn دانه نیز با سوزاندن خشک

کنترل منفی شامل RT (عدم استفاده از آنزیم RT در سنتز cDNA) و NTC (عدم استفاده از RNA در مرحله سنتز cDNA) و نیز واکنش کنترل مثبت (با استفاده از RNA

موش موجود در کیت) مطابق دستورالعمل کیت سنتز cDNA استفاده شد.

جدول ۳- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده برای ژن‌های ZIP گندم نان در واکنش‌های Real Time PCR

Table 3. Characteristics of the primers used for bread wheat ZIP genes in Real time PCR reactions

| Gene | Accession number | Primer sequence | Annealing temperature (°C) | Amplicon length (bp) |
|--------|------------------|---------------------------------|----------------------------|----------------------|
| ZIP1 | DQ490133 | F: 5'- atgacgggtctctactcgctgg | 60.3 | 71 |
| | | R: 5'- tcgatggcgattccgatgccca | 62.3 | |
| ZIP3 | DQ490131 | F: 5'- ggtgtgtcattaggagcatctgtg | 57.4 | 114 |
| | | R: 5'- agcctgtacaatgcaaccacccaa | 60.7 | |
| ZIP6 | AK333945 | F: 5'- cccaatccccaccaccaagaa | 59.3 | 89 |
| | | R: 5'- ggtcactctgtccaggaaagc | 59.3 | |
| Actin3 | KX533928 | F: 5'- gacgcacaacaggtatctgttg | 58.2 | 107 |
| | | R: 5'- agcgaggtcaagacgaaggatg | 59.3 | |

گرفته شد که سیگنال‌های فلورسنت را در فاز نمایی واکنش قطع کند. پس از به دست آوردن C_t ، مقدار بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه با روش $\Delta\Delta C_t$ (Pfaffi, 2004) محاسبه شد. آزمون نرمال بودن داده‌ها و خطاهای آزمایشی با استفاده از نرم‌افزار MINITAB نسخه ۱۹ انجام گرفت. تجزیه واریانس داده‌ها و مقایسه میانگین تیمارها (به روش دانکن در سطح احتمال یک درصد) توسط نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۲ انجام شد.

نتایج و بحث

شاخص روی-کارایی ارقام

جهت اطمینان از صحت انتخاب ارقام مورد استفاده در این تحقیق به لحاظ کارایی جذب Zn، شاخص روی-کارایی برای هر یک از ارقام محاسبه شد (جدول ۴). در بین ارقام مورد مطالعه در این تحقیق، به‌طور متوسط ارقام بیات، نیک‌نژاد، کرج ۱ و هیرمند به ترتیب با ۹۶/۷۵، ۹۰/۵۰، ۸۹/۲۵ و ۷۷/۵۰ درصد کارایی، دارای بیش‌ترین تا کم‌ترین روی-کارایی بودند. شاخص روی-کارایی این ارقام توسط خوش‌گفتارمنش و همکاران (et al., 2009)، به ترتیب ۸۷/۹، ۸۴/۹، ۸۲/۷ و ۶۷/۵ درصد و باغبان‌طبیعت و رسولی‌صدقیانی (Baghban-Tabiat and Rasouli-Sadaghiani, 2012) به ترتیب ۱۲۰، ۱۰۴، ۸۴ و ۷۳ درصد گزارش شد که روند روی-کارایی ارقام در این گزارش‌ها با نتایج حاصل از تحقیق حاضر مطابقت داشت.

میزان بیان نسبی ژن‌ها با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی (Real time PCR) به کمک دستگاه Rotor-Gene Q-Pure Detection-Qiagene (مدل ۶۰۰۰ ساخت شرکت کایژن آمریکا) اندازه‌گیری شد. جهت نرمال‌سازی داده‌ها از ژن Actin3 گندم نان به‌عنوان ژن مرجع استفاده شد. واکنش‌های Real time PCR با در نظر گرفتن سه تکرار زیستی در حجم ۱۲/۵ میکرولیتر با استفاده از کیت Maxima SYBR Green/Flourescence qPCR Master Mix (2x) (فرمنتاز، آلمان) مطابق با دستورالعمل پیشنهادی شرکت سازنده انجام شد. دوره‌های حرارتی جهت تکثیر ژن‌های مورد مطالعه با توجه به توالی آغازگرها و محصول حاصل از تکثیر ژن شامل فعال‌سازی ابتدایی آنزیم در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه در یک دوره و سپس ۴۰ چرخه شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای اتصال مربوط به هر ژن (جدول ۳) به مدت ۳۰ ثانیه و بسط آغازگرها در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۴۰ ثانیه انجام شد. پس از انجام واکنش، منحنی ذوب (Melt curve) هر کدام از ژن‌ها رسم و صحت تکثیر محصول مربوط به هر ژن با استفاده از منحنی ذوب مربوط به آن ژن و نیز آنالیز ژل تأیید شد.

کمیت نسبی در واکنش Real time PCR به‌وسیله اندازه‌گیری افزایش تشعشع فلورسنت در نتیجه اتصال رنگ SYBR Green با محصول دو رشته‌ای تکثیر شده با نرم‌افزار Rotor-Gene Q انجام گرفت. پس از پایان واکنش‌ها، مقدار حد آستانه (Threshold) طوری در نظر

جدول ۴- درصد روی-کارایی (شاخص ZE) ارقام گندم نان مطالعه شده در این تحقیق

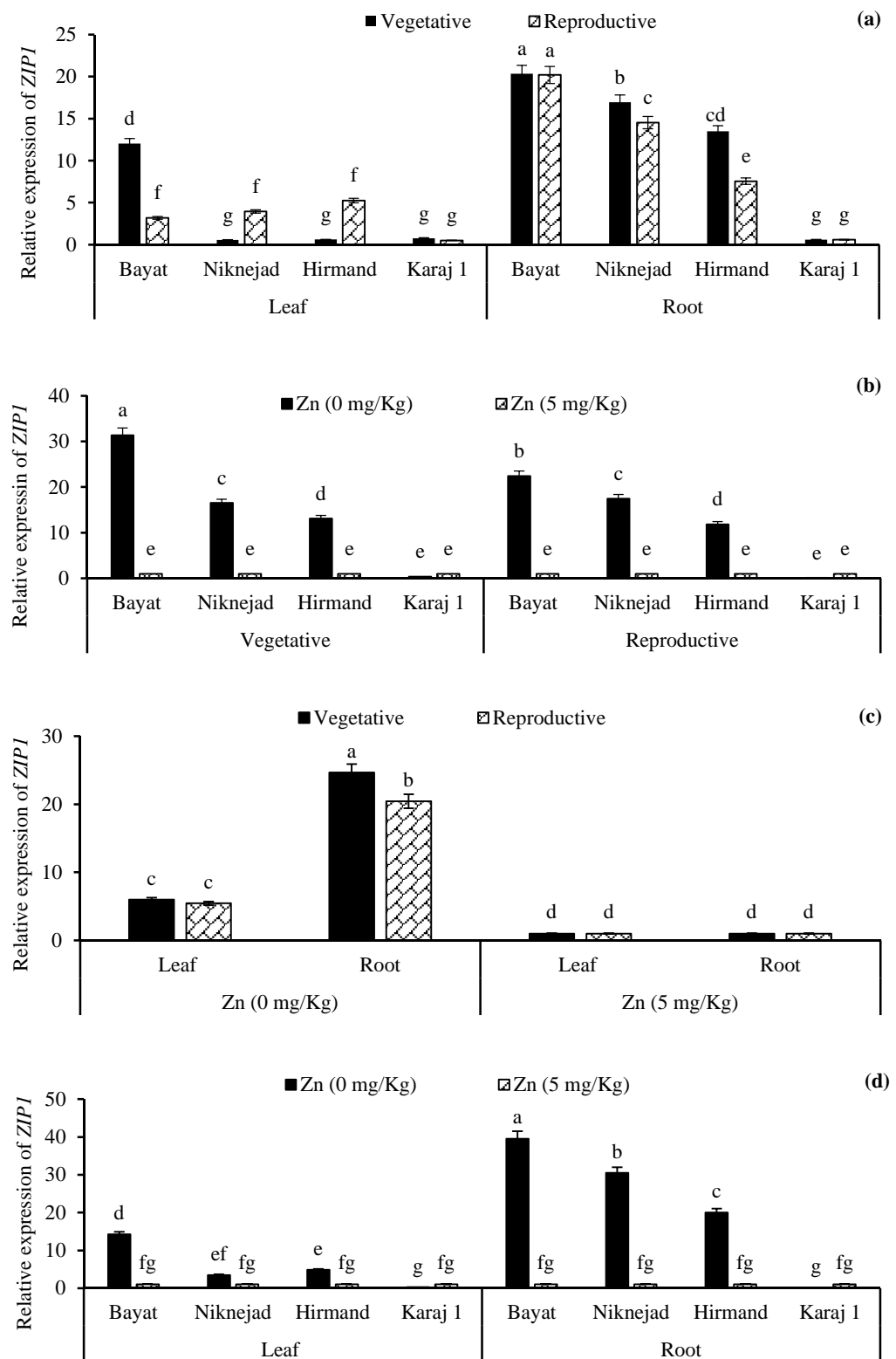
Table 4. Zn efficiency (ZE index) percentage of bread wheat cultivars studied in this research

| Cultivar | Root | Shoot | Grain | Whole aerial tissues | Average (%) |
|----------|------|-------|-------|----------------------|-------------|
| Bayat | 0.98 | 0.89 | 0.93 | 1.07 | 96.75 |
| Niknejad | 0.94 | 0.84 | 0.87 | 0.97 | 90.50 |
| Hirmand | 0.79 | 0.80 | 0.74 | 0.77 | 77.50 |
| Karaj 1 | 0.93 | 0.88 | 0.89 | 0.87 | 89.25 |

بیان نسبی ژن ZIP1

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۵) بیان نسبی ژن ZIP1 نشان داد که تمامی آثار اصلی و برهمکنش بین فاکتورها معنی‌دار ($P \leq 0.01$) بودند. مقایسه میانگین برهمکنش بافت \times رقم \times مرحله نمونه‌برداری نشان داد که بیش‌ترین میزان افزایش بیان ژن ZIP1 (افزایش ۲۰ برابری نسبت به شاهد) در ریشه رقم روی-کارای بیات در هر دو مرحله رویشی و زایشی مشاهده شد (شکل ۱-a). همچنین در همه ارقام مورد مطالعه به جز رقم کرج ۱، میزان بیان این ژن در ریشه به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از برگ بود. مقایسه میانگین برهمکنش $\text{Zn} \times$ رقم \times مرحله نمونه‌برداری (شکل ۱-b) نشان داد که بیان نسبی ژن ZIP1 در شرایط کمبود Zn در ارقام روی-کارا در هر دو مرحله رویشی و زایشی به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از ارقام روی-ناکارا بود، به‌طوری‌که بیش‌ترین میزان افزایش بیان این ژن (۳۱/۳۷ برابر) در رقم روی-کارای بیات در مرحله رویشی تحت شرایط کمبود Zn مشاهده شد. کم‌ترین میزان بیان این ژن در رقم روی-ناکارا کرج ۱ مشاهده شد، به‌طوری‌که میزان بیان در این رقم روی-ناکارا در مرحله رویشی و زایشی به‌ترتیب ۰/۳۶ و ۰/۱ برابر شاهد کاهش یافت. همچنین مقایسه میانگین اثر سطح $\text{Zn} \times$ بافت \times مرحله نمونه‌برداری (شکل ۱-c) نشان داد که تحت شرایط کمبود Zn بیان نسبی این ژن در ریشه در مرحله رویشی بیش‌تر از مرحله زایشی ($P \leq 0.01$) بود. با این‌حال، بین مراحل نمونه‌برداری در بافت برگ اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. مقایسه میانگین برهمکنش $\text{Zn} \times$ رقم \times بافت (شکل ۱-d) نیز نشان داد که بیان نسبی ژن ZIP1 تحت شرایط کمبود Zn، در ریشه ارقام روی-کارا به‌طور معنی‌داری ($P \leq 0.01$) بیش‌تر از ریشه ارقام روی-ناکارا بود.

ژن *AtZIP2* نزدیک‌ترین ژن خانواده ZIP در *Arabidopsis thaliana* به ژن ZIP1 در گندم نان است (Tiong et al., 2015). این ژن برای اولین بار به‌عنوان ترانسپورتر Zn در آرآیدوپسیس شناسایی و همسانه‌سازی شد و گزارش شد که این ژن کد کننده یک پروتئین ترانس ممبران است و انتقال منگنز (و احتمالاً Zn) را از ریشه به شاخساره واسطه‌گری می‌کند (Grotz et al., 1998). دورماز و همکاران (Durmaz et al., 2011) در گندم وحشی اِمِر (*T. dicoccoides*) گزارش کردند که سطح رونوشت ژن ZIP1 در ریشه ارقام حساس و متحمل به کمبود Zn با کاهش سطح Zn افزایش می‌یابد. در برنج گزارش شد که بیان ژن ZIP1 تحت هر دو شرایط کمبود Zn و Zn کافی فقط در ریشه و تا حدود بسیار کمی در پانیکول بیان می‌شود و با حذف Zn از محیط کشت، میزان بیان این ژن شدیداً افزایش می‌یابد (Chen et al., 2008). بیان ژن *OsZIP1* در ریشه برنج توسط رامش و همکاران (Ramesh et al., 2003) نیز تأیید شد. آن‌ها تصریح کردند که تحت شرایط Zn کافی اثری از رونوشت‌های این ژن در ریشه مشاهده نمی‌شود. در جو ترا ریخته با ژن ZIP1 آرآیدوپسیس، مشاهده شد که با افزایش بیان این ژن، محتوای روی و آهن در دانه جو افزایش می‌یابد (Ramesh et al., 2004). مطالعات انجام یافته در گیاه *Medicago truncatula* نیز نشان داد ژن ZIP1 در ریشه و برگ این گیاه در شرایط کمبود Zn بیان می‌شود (Lopez-Millan et al., 2004). با توجه به افزایش بیان این ژن در ریشه در ارقام روی-کارای گندم نان تحت شرایط کمبود Zn خاک، احتمالاً این ژن وظیفه جذب روی از خاک را برعهده داشته باشد و در انتقال آن به برگ و اندام‌های هوایی نقش موثری نداشته باشد.



شکل ۱- مقایسه میانگین برهمکنش بافت × رقم × مرحله نمونه‌برداری (a)، Zn × رقم × مرحله نمونه‌برداری (b)، Zn × بافت × مرحله نمونه‌برداری (c) و Zn × بافت (d) بر بیان ژن ZIP1 در ارقام گندم نان. ستون‌های دارای حروف مشابه، اختلاف معنی‌داری بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک درصد ندارند.

Figure 1. Mean comparisons of tissue × cultivar × sampling stage (a), Zn × cultivar × sampling stage (b), Zn × tissue × sampling stage (c) and Zn × cultivar × tissue (d) on the relative expression of ZIP1 gene in bread wheat cultivars. The columns followed by the similar letters are not significantly different based on Duncan's multiple range test at %1 probability level.

جدول ۵- تجزیه واریانس بیان نسبی ژن‌های ZIP در ریشه و برگ ارقام گندم نان مورد مطالعه در مراحل رشد رویشی و زایشی
 Table 5. Analysis of variance for relative expression of ZIP genes in root and leaf of the studied bread wheat cultivars in vegetative and reproductive stages

| Source of variations [†] | df | Mean of square | | |
|-----------------------------------|----|----------------|-----------|---------------------|
| | | ZIP1 | ZIP3 | ZIP6 |
| Zn | 1 | 2763.69** | 1991.87** | 182.38** |
| Cl | 3 | 489.06** | 294.33** | 81.49** |
| Ts | 1 | 1135.88** | 143.63** | 31.86** |
| Ti | 1 | 22.94** | 1656.17** | 83.67** |
| Zn × Cl | 3 | 489.06** | 294.33** | 81.49** |
| Zn × Ts | 1 | 1135.88** | 143.63** | 31.86** |
| Zn × Ti | 1 | 22.94** | 1656.17** | 83.67** |
| Cl × Ts | 3 | 154.69** | 160.15** | 85.25** |
| Cl × Ti | 3 | 20.09** | 201.79** | 17.66** |
| Ts × Ti | 1 | 13.79** | 149.28** | 0.008 ^{ns} |
| Zn × Cl × Ts | 3 | 154.69** | 160.15** | 85.25** |
| Zn × Ts × Ti | 1 | 13.79** | 149.28** | 0.008 ^{ns} |
| Zn × Cl × Ti | 3 | 20.09** | 605.38** | 17.66** |
| Cl × Ts × Ti | 3 | 69.29** | 430.07** | 17.55** |
| Zn × Cl × Ts × Ti | 3 | 69.29** | 430.07** | 17.55** |
| Error | 64 | 1.39 | 1.80 | 0.33 |
| CV (%) | | 15.55 | 20.41 | 21.41 |

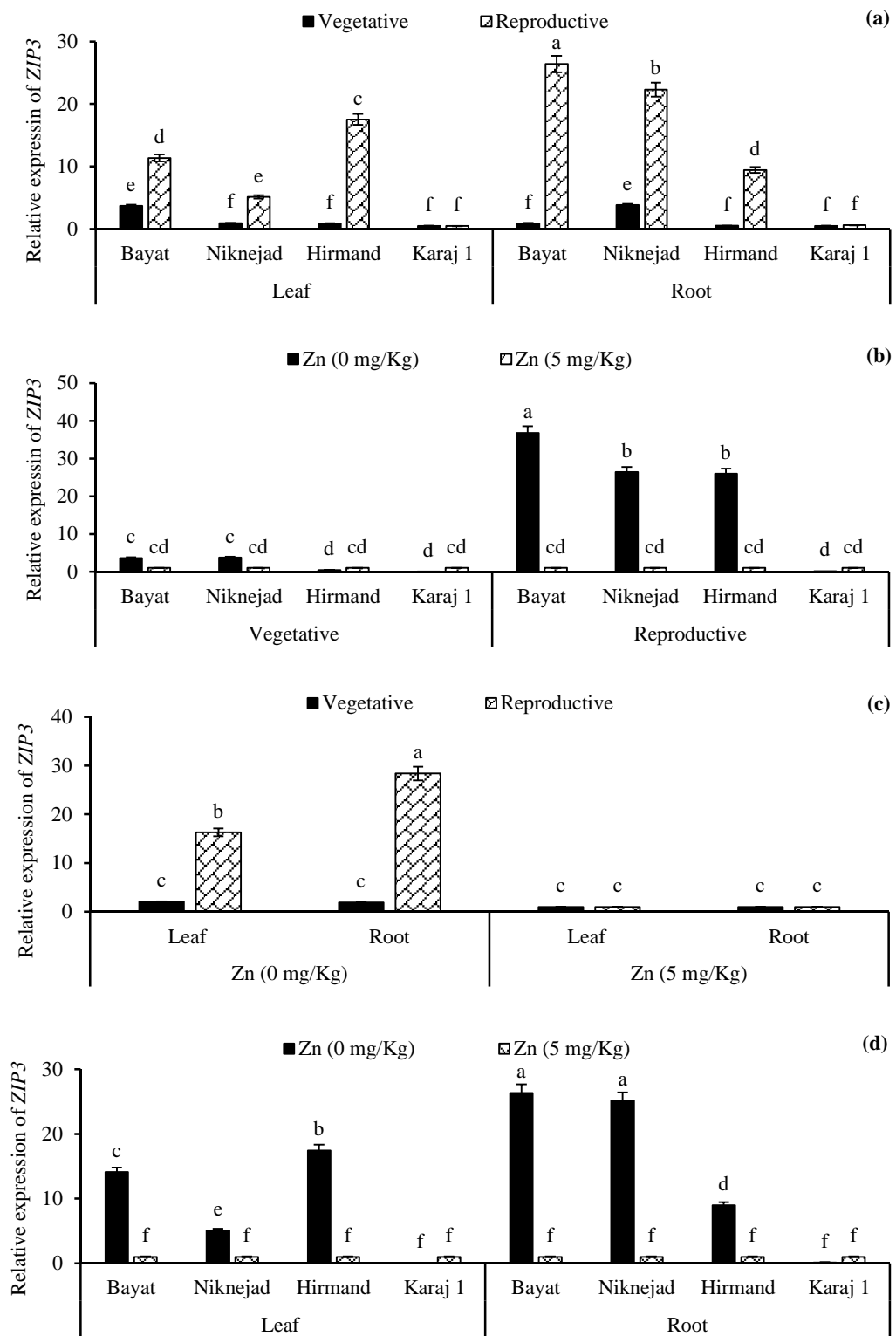
^{ns} and **: Not-significant and significant at 1% probability level, respectively.

[†]: Zn, Zinc level; Cl, cultivar; Ts, tissue; Ti, sampling stage.

بیان نسبی ژن ZIP3

تجزیه واریانس بیان نسبی ژن ZIP3 نشان داد تمامی اثرات اصلی و چندجانبه معنی‌دار ($P \leq 0.01$) هستند (جدول ۵). نتایج مقایسه میانگین برهمکنش بافت × رقم × مرحله نمونه‌برداری (شکل ۲-a) نشان داد که ژن ZIP3 در هر دو اندام ریشه و برگ بیان می‌شود. بیش‌ترین میزان بیان نسبی این ژن در ریشه ارقام روی-کارا (بیات و نیک‌نژاد) مشاهده شد. نتایج مقایسه میانگین برهمکنش Zn × رقم × مرحله نمونه‌برداری (شکل ۲-b) نشان داد که بیش‌ترین میزان بیان ژن ZIP3 در مرحله زایشی در رقم روی-کارای بیات تحت شرایط کمبود Zn دیده می‌شود، با این‌حال نتایج نشان داد که تحت شرایط کمبود Zn در مرحله رویشی نیز بیان نسبی این ژن در ارقام روی-کارا به‌طور معنی‌داری

($P \leq 0.01$) بیش‌تر از ارقام روی-ناکارا بود. در مقایسه میانگین برهمکنش Zn × بافت × مرحله نمونه‌برداری (شکل ۲-c) نیز مشخص شد که تحت شرایط کمبود Zn بیان نسبی این ژن در مرحله زایشی در ریشه به‌میزان قابل توجهی ($P \leq 0.01$) بیش‌تر از برگ است، ولی در عین‌حال تفاوت معنی‌داری بین ریشه و برگ مشاهده نشد. نتایج حاصل از مقایسه میانگین برهمکنش Zn × رقم × بافت (شکل ۲-d) حاکی از تفاوت بسیار معنی‌دار ($P \leq 0.01$) میزان بیان نسبی این ژن تحت شرایط کمبود روی نسبت به شرایط کفایت روی بود، به‌طوری‌که بیش‌ترین میزان بیان نسبی این ژن در ریشه دو رقم روی-کارای بیات و نیک‌نژاد (به‌ترتیب با بیش از ۲۶ و ۲۵ برابر نسبت به شرایط کفایت Zn) مشاهده شد.



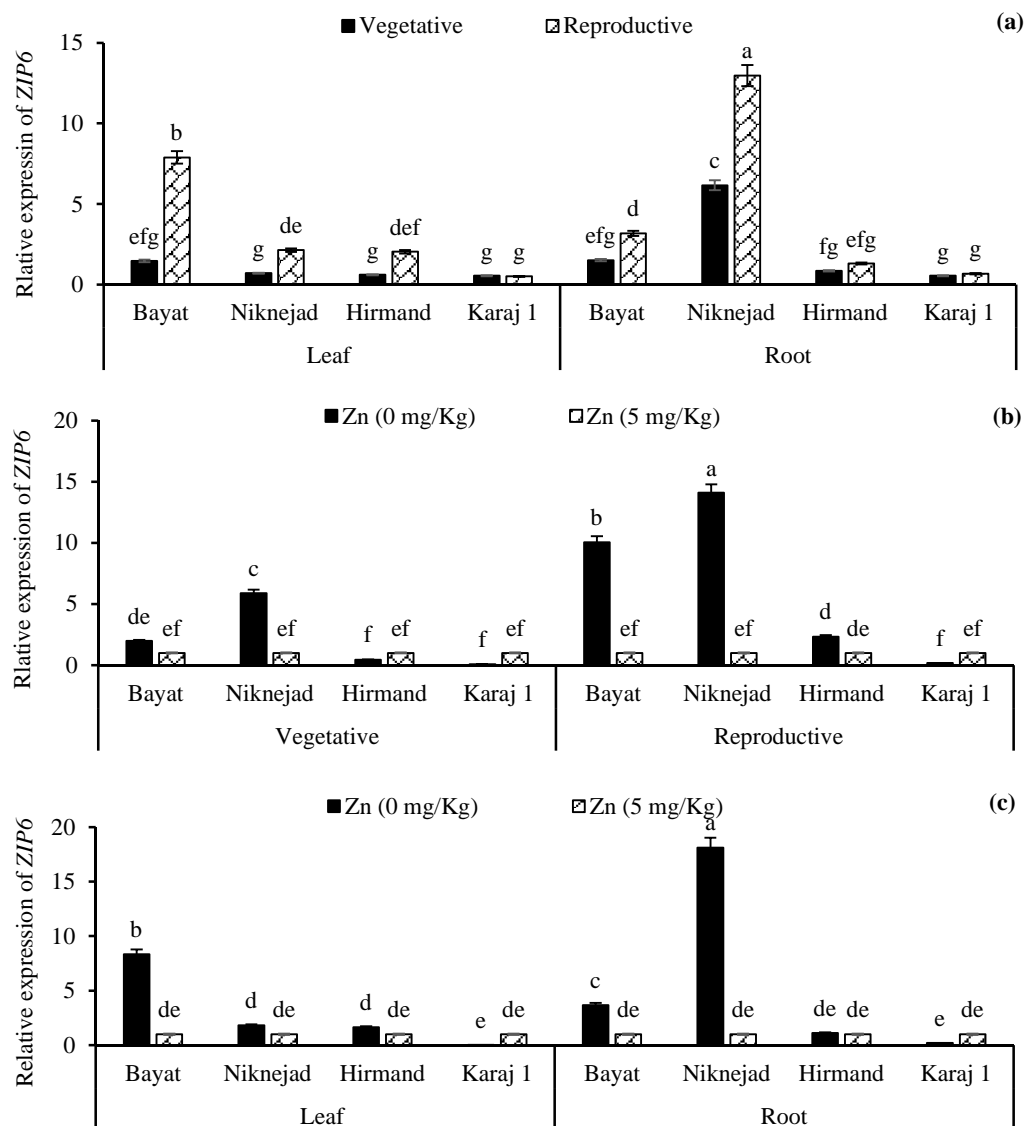
شکل ۲- مقایسه میانگین برهمکنش بافت × رقم × مرحله نمونه‌برداری (a)، Zn × رقم × مرحله نمونه‌برداری (b)، Zn × بافت × مرحله نمونه‌برداری (c) و Zn × رقم × بافت (d) بر بیان ژن ZIP3 در ارقام گندم نان. ستون‌های دارای حروف مشابه، اختلاف معنی‌داری بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک درصد ندارند.

Figure 2. Mean comparisons of tissue × cultivar × sampling stage (a), Zn × cultivar × sampling stage (b), Zn × tissue × sampling stage (c) and Zn × cultivar × tissue (d) on the relative expression of ZIP3 gene in bread wheat cultivars. The columns followed by the similar letters are not significantly different based on Duncan's multiple range test at %1 probability level.

بیان ژن ZIP6

تجزیه واریانس بیان ژن ZIP6 نشان داد که به غیر از دو برهمکنش Zn × بافت × مرحله نمونه‌برداری و بافت × مرحله نمونه‌برداری، تمامی آثار معنی‌دار ($P \leq 0.01$) بودند (جدول ۵). نتایج مقایسه میانگین اثر رقم × اندام × مرحله نمونه‌برداری (شکل ۳-a) نشان داد که بیش‌ترین میزان بیان این ژن در ریشه رقم نیک‌نژاد در مرحله زایشی مشاهده شد و میزان بیان این ژن در همه ارقام به جز کرج ۱، در مرحله زایشی بیش از مرحله رویشی بود. همچنین این ژن در ریشه ارقام روی-کارا بیش از روی-ناکارا بیان داشت، به طوری که میزان بیان این ژن در ریشه ارقام روی-کارای نیک‌نژاد و بیات به ترتیب ۱۲/۹۷ و ۳/۱۷ برابر شاهد بود، در حالی که این میزان در ریشه ارقام روی-ناکارای هیرمند و کرج ۱ به ترتیب ۱/۳ و ۰/۶۷ برابر شاهد بود. در مرحله رویشی، تفاوت معنی‌داری بین میزان بیان این ژن در ارقام روی-کارا و روی-ناکارا مشاهده نشد. بیان بالای این ژن در ریشه ارقام روی-کارا در مرحله زایشی احتمالاً دلیلی بر نقش این ژن در جذب Zn از خاک و انتقال آن به اندام‌های هوایی در مرحله زایشی است. مقایسه میانگین برهمکنش Zn × رقم × مرحله نمونه‌برداری (شکل ۳-b) نشان داد که بیان این ژن در شرایط کمبود Zn در ارقام روی-کارا در هر دو مرحله رویشی و زایشی بیش‌تر از ارقام روی-ناکارا بود. بیش‌ترین میزان بیان این ژن در ارقام روی-کارای نیک‌نژاد و بیات در شرایط کمبود Zn در مرحله زایشی (به ترتیب با ۱۴/۰۹ و ۱۰/۰۵ برابر شاهد) مشاهده شد. مقایسه میانگین Zn × رقم × بافت (شکل ۳-c) نیز نشان داد که بیان این ژن در شرایط کمبود Zn به‌طور معنی‌داری ($P \leq 0.01$) نسبت به شرایط کفایت Zn افزایش یافت. بنابراین، این نتایج بیانگر نقش و فعالیت این ژن در ارقام روی-کارا تحت شرایط کمبود Zn می‌باشد. در گیاه آرابیدوپسیس نیز بیان بالای این ژن در ریشه نسبت به شاخساره گزارش شده است (Milner et al., 2013). در تحقیق دیگری که روی برخی ژن‌های خانواده ZIP در گندم در شرایط کشت هیدروپونیک و حذف Zn از محلول غذایی انجام گرفت، افزایش آهسته بیان ژن ZIP6 گزارش شد (Evens et al., 2017). به نظر می‌رسد گزارش آهسته بودن بیان این ژن، به نوعی نشان-دهنده نتایج حاصل از تحقیق حاضر مبنی بر افزایش بیان در مرحله زایشی باشد.

ژن *AtZIP1* نزدیک‌ترین عضو خانواده ZIP در آرابیدوپسیس به ZIP3 در گندم (Tiong et al., 2015)، اولین بار در *Arabidopsis thaliana* گزارش شد. در این مطالعه با استفاده از آزمایشات تکمیلی توسط مخمر ثابت شد که این ژن کدکننده یک ترانسپورتر روی است و در ریشه و برگ بیان می‌شود (Grotz et al., 1998). در جو نیز گزارش شد که ژن ZIP3 تحت شرایط کمبود Zn در ریشه بیان می‌شود. همچنین پیشنهاد شد که این ژن از عوامل دخیل در تنظیم روی در ریشه جو و یکی از ژن‌های بسیار مهم در جذب Zn تحت شرایط کمبود روی است (Pedas et al., 2009). افزایش حداقل سه برابری بیان ژن ZIP3 تحت شرایط کمبود Zn در ریشه و شاخساره جو گزارش و بیان شد که ژن ZIP3 فعالانه در جذب و انتقال روی از ریشه به شاخساره جو در شرایط کمبود Zn شرکت دارد (Tiong et al., 2015). نتایج این مطالعه با تحقیق حاضر (افزایش بیان ژن ZIP3 در شرایط کمبود Zn در ریشه و برگ گندم نان) همخوانی دارد. همچنین، الگوی بیان ژن ZIP3 در ارقام برنج روی-کارا و روی-ناکارا در دو شرایط با Zn کافی و کمبود آن مطالعه و گزارش شد که این ژن در ریشه، شاخساره و خوشه بیان می‌شود، اما تحت شرایط کمبود Zn بیان آن فقط در ریشه افزایش یافت و در ریشه رقم روی-کارا بیش‌تر از رقم روی-ناکارا بود (Chen et al., 2008). در ذرت گزارش شد که بر خلاف ژن‌های دیگر ZIP بیان ژن ZIP3 در پاسخ به کاهش Zn در محیط به سرعت در ریشه و برگ افزایش یافت (Li et al., 2013). در آرابیدوپسیس تراریخته با ژن ZIP3 ذرت، افزایش بیان این ژن باعث افزایش میزان Zn در ریشه و کاهش آن در شاخساره شد (Li et al., 2015). در سویا نیز گزارش شد که ژن ZIP1 با وجود داشتن شباهت‌های زیاد ساختمانی و عملکردی به‌عنوان ترانسپورتر Zn با ZIP1 آرابیدوپسیس، در ریشه، ساقه و برگ سویا بیان نشد و فقط در گره‌ها بیان شد (Moreau et al., 2002). به‌طور کلی، نتایج تحقیق حاضر نشان داد که ژن ZIP3 در گندم نان در ریشه و برگ بیان می‌شود، ولی میزان بیان آن به‌میزان قابل توجهی در ریشه نسبت به برگ و در مرحله زایشی نسبت به رویشی بیش‌تر است. همچنین، بیان این ژن تحت شرایط کمبود Zn در ارقام روی-کارا بیش از ارقام روی-ناکارا بود. بنابراین، احتمالاً وظیفه اصلی این ژن جذب Zn از خاک و انتقال آن به اندام‌های هوایی و احتمالاً دانه در اواخر دوره رشد گیاه می‌باشد.



شکل ۳- مقایسه میانگین برهمکنش بافت × رقم × مرحله نمونه برداری (a)، Zn × رقم × مرحله نمونه برداری (b) و Zn × رقم × بافت (c) بر بیان ژن ZIP6 در ارقام گندم نان. ستون‌های دارای حروف مشابه، اختلاف معنی‌داری بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک درصد ندارند.

Figure 3. Mean comparisons of tissue × cultivar × sampling stage (a), Zn × cultivar × sampling stage (b) and Zn × cultivar × tissue (c) on the relative expression of ZIP6 gene in bread wheat cultivars. The columns followed by the similar letters are not significantly different based on Duncan's multiple range test at %1 probability level.

مشاهده شد که تحت شرایط کمبود Zn، رونوشت‌های ژن ZIP6 در ریشه و شاخساره افزایش می‌یابند و این افزایش در ریشه بیش‌تر از شاخساره است (Chen *et al.*, 2008; Kavitha *et al.*, 2015). البته در تعدادی از تحقیقات انجام شده در گیاه برنج گزارش شده است که ژن ZIP6 همانند ژن‌های OsIRT1، OsIRT2 و OsZIP7 در انتقال آهن بیش‌تر از انتقال Zn دخالت دارد (Bugchio *et al.*, 2002; Ishimaru *et al.*, 2006; Kavitha *et al.*, 2015).

تیونگ و همکاران (Tiong *et al.*, 2015) نیز در مطالعه‌ای که روی ژن‌های خانواده ZIP در جو انجام دادند، گزارش کردند که ژن ZIP6 در ریشه بیش‌تر از شاخساره بیان شد و بیان آن به‌طور معنی‌داری تحت شرایط کمبود Zn افزایش یافت. همچنین، در این مطالعه گزارش شد که با افزایش سن گیاه نیز بیان این ژن افزایش یافت. این گزارش نتایج حاصل از مطالعه حاضر در مورد بیان بالای این ژن در ریشه نسبت به برگ و نیز افزایش بیان در مرحله زایشی نسبت به مرحله رویشی را تأیید می‌کند. در برنج نیز

همبستگی بین بیان نسبی ژن‌های ZIP در ریشه و برگ گندم و محتوای Zn دانه

نتایج ضرایب همبستگی (جدول ۶) نشان داد که بین محتوای Zn دانه در شرایط کفایت روی و میزان بیان نسبی ژن‌های ZIP1 و ZIP6 در برگ در مرحله رویشی همبستگی منفی معنی‌داری ($P \leq 0.05$) وجود داشت. به عبارت دیگر، در شرایط وجود مقدار کافی روی در خاک، بیان ژن‌های ZIP1 و ZIP6 در برگ در مرحله رویشی کاهش یافت. چنین همبستگی منفی بالا (ولی غیرمعنی‌دار) برای ژن ZIP3 نیز در برگ در مرحله رویشی مشاهده شد. بنابراین می‌توان چنین بیان کرد که افزایش بیان ژن‌های خانواده ZIP در برگ در مرحله رویشی موجب کاهش

محتوای Zn دانه می‌شوند. به بیان دیگر، افزایش بیان ژن‌های خانواده ZIP در برگ در مرحله رویشی، احتمالاً باعث انتقال Zn از برگ به بافت‌های مصرف کننده Zn شده و موجب افزایش مصرف Zn در سوخت و سازهای جاری گیاه و عدم ذخیره‌سازی آن جهت انتقال به دانه در مراحل بعدی می‌شود. از طرفی مشاهده شد که بین محتوای Zn دانه در شرایط کمبود Zn و میزان بیان نسبی ژن ZIP6 در برگ در مرحله زایشی همبستگی مثبت و معنی‌داری ($P \leq 0.05$) وجود دارد. بنابراین، احتمالاً با افزایش بیان ژن ZIP6 در برگ در مرحله پر شدن دانه، محتوای Zn دانه نیز افزایش می‌یابد. این همبستگی احتمالاً دلیلی بر نقش ژن ZIP6 در انتقال Zn از بافت برگ به دانه و در نتیجه افزایش Zn دانه باشد.

جدول ۶- ضرایب همبستگی بین شاخص روی-کارایی و محتوای Zn دانه با بیان نسبی ژن‌های ZIP1، ZIP3 و ZIP6 در ریشه و برگ گندم نان در مراحل مختلف رشدی

Table 6. Correlation coefficients among Zn efficiency index and grain Zn content with ZIP1, ZIP3 and ZIP6 relative expression in root and leaf of bread wheat at different growth stages

| Trait [†] | KZE | KC0 | KC5 | LV1 | RV1 | LF1 | RF1 | LV3 | RV3 | LF3 | RF3 | LV6 | RV6 | LF6 | RF6 |
|--------------------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|
| KZE | 1 | 0.02 | -0.77 | 0.59 | 0.06 | -0.65 | 0.37 | 0.52 | 0.18 | -0.63 | 0.38 | 0.58 | 0.16 | 0.06 | 0.18 |
| KC0 | 0.02 | 1 | -0.63 | 0.79 | 0.44 | 0.26 | 0.44 | 0.79 | -0.63 | 0.68 | 0.31 | 0.73 | -0.59 | 0.92* | -0.57 |
| KC5 | -0.77 | -0.63 | 1 | -0.97* | -0.45 | 0.23 | -0.68 | -0.93* | 0.15 | 0.01 | -0.61 | -0.95* | 0.13 | -0.67 | 0.09 |

* and **: Significant at the 5% probability level.

[†]: KZE, Grain Zn efficiency index; KC0, Grain Zn content under Zinc deficiency conditions; KC5, Grain Zn content under Zinc sufficient conditions; LV1, ZIP1 expression in leaf at vegetative stage; RV1, ZIP1 expression in root at vegetative stage; LF1, ZIP1 expression in leaf at reproductive stage; RF1, ZIP1 expression in root at reproductive stage; LV3, ZIP3 expression in leaf at vegetative stage; RV3, ZIP3 expression in root at vegetative stage; LF3, ZIP3 expression in leaf at reproductive stage; RF3, ZIP3 expression in root at reproductive stage; LV6, ZIP6 expression in leaf at vegetative stage; RV6, ZIP6 expression in root at vegetative stage; LF6, ZIP6 expression in leaf at reproductive stage; RF6, ZIP6 expression in root at reproductive stage.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این تحقیق نشان داد که ژن‌های ZIP3، ZIP1 و ZIP6 به‌عنوان ژن‌های کدکننده پروتئین‌های ترانسپورتر Zn در گندم قادر هستند در صورت بروز تنش کمبود روی، با افزایش بیان و در نتیجه افزایش جذب روی در تنظیم Zn در سلول‌ها مشارکت کنند. ژن ZIP1 با بیان در ریشه در هر دو مرحله رویشی و زایشی، احتمالاً وظیفه جذب روی از

خاک را به‌عهده دارد، در حالی که ژن‌های ZIP3 و ZIP6 با بیان در ریشه و برگ، احتمالاً در جذب Zn از خاک و انتقال در گیاه به‌ترتیب در مرحله زایشی و مراحل رویشی و زایشی دخالت دارند. همچنین نتایج این تحقیق نشان داد که بیان نسبی ژن‌های خانواده ZIP در ارقام روی-کارا بیش‌تر از ارقام روی-ناکارا می‌باشد و با افزایش بیان ZIP6، محتوای Zn دانه گندم به‌ویژه در ارقام روی-کارا افزایش می‌یابد.

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). **Dryland Agriculture** 3 (1): 77-90. (In Persian with English Abstract).
- Assunção, A. G. L., Martins, P. D. A. 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 hyper-accumulator *Thlaspi caerulescens*. **Plant, Cell and Environment** 24 (2): 217-226.
- Astudillo, C., Fernandez, A., Blair, M. W. and Cichy, K. A. 2013.** The *Phaseolus vulgaris* ZIP gene family: Identification, characterization, mapping and gene expression. **Frontiers in Plant Science** 4: 286.
- Baghban-Tabiat, S. and Rasouli-Sadaghiani, M. 2012.** Investigation of Zn utilization and acquisition efficiency in different wheat genotypes at greenhouse conditions. **Journal of Science and Technology of Greenhouse Culture** 3 (2):17-32. (In Persian with English Abstract).
- Bughio, N., Yamaguchi, H., Nishizawa, N. K., Nakanishi, H. and Mori, S. 2002.** Cloning an iron-regulated metal transporter from rice. **Journal of Experimental Botany** 53 (374): 1677-1682.
- Cakmak, I., Graham, R. and Welch, R. M. 2002.** Agricultural and molecular genetic approaches to improving nutrition and preventing micronutrient malnutrition globally. In: Cakmak I. and Welch, R. M. (Eds.). Encyclopedia of life support systems. Eolss Publishers, Oxford. pp: 1075-1099.
- 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.
- Durmaz, E., Coruh, C., Dinler, G., Grusak, M. A., Peleg, Z., Saranga, Y., Fahima, T., Yazici, A., Ozturk, L., Cakmak, I. and Budak, H. 2011.** Expression and cellular localization of ZIP1 transporter under zinc deficiency in wild emmer wheat. **Plant Molecular Biology Reporter** 29 (3): 582-596.
- Emam, Y. 2013.** Cereal crops. Shiraz University Press, Shiraz, Iran. (In Persian with English Abstract).
- 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* L.). **The Plant Journal** 92 (2): 291-304.
- Ghasemi, S., Khoshgoftarmanesh, A. H., Sayed-Tabatabaei, B. E. and Khaksar, G. 2015.** Expression level of ZIP1 and ZIP5 transporters in root and leaves of three different zinc-efficiency wheat cultivars. **Journal of Plant Process and Function** 4 (11): 23-32. (In Persian with English Abstract).
- Graham, R. D., Asher, J. S. and Hynes, S. C. 1992.** Selecting zinc-efficient cereal genotypes for soil of low zinc status. **Plant and Soil** 146: 241-250.
- Graham, R. D. and Rengel, Z. 1993.** Genotypic variation in Zn uptake and utilization by plants. In: Robson, A. D. (Ed). Zinc in soils and plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp: 107-114.
- Grotz, N., Fox, T., Connolly, E., Park, W., Guerinot, M. L. and Eide, D. 1998.** Identification of a family of zinc transporter genes from *Arabidopsis* that respond to zinc deficiency. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 95 (12): 7220-7224.
- Halim, G., Emam, Y. and Shakeri, E. 2018.** Evaluation of yield, yield components and stress tolerance indices in bread wheat cultivars at post-anthesis irrigation cut-off. **Journal of Crop Production and Processing** 7 (4): 121-134. (In Persian with English Abstract).
- Ishimaru, Y., Masuda, H., Suzuki, M., Bashir, K., Takahashi, M., Nakanishi, H., Mori, S. and Nishizawa, N. K. 2007.** Overexpression of the *OsZIP4* zinc transporter confers disarrangement of zinc distribution in rice plants. **Journal of Experimental Botany** 58 (11): 2909-2915.
- Ishimaru, Y., Suzuki, M., Kobayashi, T., Takahashi, M., Nakanishi, H., Mori, S. and Nishizawa, N. K. 2005.** *OsZIP4*, a novel zinc-regulated zinc transporter in rice. **Journal of Experimental Botany** 56 (422): 3207-3214.
- Ishimaru, Y., Suzuki, M., Tsukamoto, T., Suzuki, K., Nakazono, M., Kobayashi, T., Wada, Y., Watanabe, S., Matsushashi, S., Takahashi, M., Nakanishi, H., Mori, S. and Nishizawa, N. K. 2006.** Rice plants take up iron as an Fe³⁺-phytosiderophore and as Fe²⁺. **The Plant Journal** 45 (3): 335-346.
- Kalayci, M., Torun, B., Eker, S., Aydin, M., Ozturk, L. and Cakmak, I. 1999.** Grain yield, zinc efficiency and zinc concentration of wheat genotypes grown in a zinc-deficient calcareous soil in field and greenhouse. **Field Crops Research** 63: 87-98.

- Kambe, T., Yamaguchi-Iwai, Y., Sasaki, R. and Nagao, M. 2004.** Overview of mammalian zinc transporters. *Cellular and Molecular Life Sciences* 61 (1): 49-68.
- 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: 165-74.
- Khoshgofarmanesh, A. H., Sadrarhami, A., Sharifi, H. R., Afiuni, D. and Schulin, R. 2009.** Selecting zinc-efficient wheat genotypes with high grain yield using a stress tolerance index. *Agronomy Journal* 101 (6): 1409-1416.
- Lee, S., Jeong, H. J., Kim, S. A., Lee, J., Guerinot, M. L. and An, G. 2010a.** *OsZIP5* is a plasma membrane zinc transporter in rice. *Plant Molecular Biology* 73 (4-5): 507-517.
- Lee, S., Kim, S. A., Lee, J., Guerinot, M. L. and An, G. 2010b.** Zinc deficiency-inducible *OsZIP8* encodes a plasma membrane-localized zinc transporter in rice. *Molecules and Cells* 29 (6): 551-558.
- Li, S., Zhou, X., Huang, Y., Zhu, L., Zhang, S., Zhao, Y., Guo, J., Chen, J. and Chen, R. 2013.** Identification and characterization of the zinc-regulated transporters, iron-regulated transporter-like protein (ZIP) gene family in maize. *BMC Plant Biology* 13: 114.
- Li, S., Zhou, X., Li, H., Liu, Y., Zhu, L., Guo, J., Liu, X., Fan, Y., Chen, J. and Chen, R. 2015.** Overexpression of *ZmIRT1* and *ZmZIP3* enhances iron and zinc accumulation in transgenic *Arabidopsis*. *PloS One* 10 (8): e0136647.
- Lopez-Millan, A. F., Ellis, D. R. and Grusak, M. A. 2004.** Identification and characterization of several new members of the ZIP family of metal ion transporters in *Medicago truncatula*. *Plant Molecular Biology* 54 (4): 583-596.
- Milner, M. J., Seamon, J., Craft, E. and Kochian, L. V. 2013.** Transport properties of members of the ZIP family in plants and their role in Zn and Mn homeostasis. *Journal of Experimental Botany* 64 (1): 369-381.
- Moreau, S., Thomson, R. M., Kaiser, B. N., Trevaskis, B., Guerinot, M. L., Udvardi, M. K., Puppo, A. and Day, D. A. 2002.** *GmZIP1* encodes a symbiosis-specific zinc transporter in soybean. *Journal of Biological Chemistry* 277 (7): 4738-4746.
- Pandey, N., Gupta, B. and Pathak, G. C. 2012.** Antioxidant responses of pea genotypes to zinc deficiency. *Russian Journal of Plant Physiology* 59 (2): 198-205.
- Pedas, P., Schjoerring, J. K. and Husted, S. 2009.** Identification and characterization of zinc-starvation-induced ZIP transporters from barley roots. *Plant Physiology and Biochemistry* 47 (5): 377-383.
- Pfaffi, M. W. 2004.** Quantification strategies in real-time PCR. In: Bustin, S. A. (Ed.). The real-time PCR encyclopedia A-Z of quantitative PCR. International University Line, La Jolla, CA, USA. pp: 87-112.
- Ramesh, S. A., Choimes, S. and Schachtman, D. P. 2004.** Over-expression of an *Arabidopsis* zinc transporter in *Hordeum vulgare* increases short-term zinc uptake after zinc deprivation and seed zinc content. *Plant Molecular Biology* 54 (3): 373-385.
- Ramesh, S. A., Shin, R., Eide, D. J. and Schachtman, D. P. 2003.** Differential metal selectivity and gene expression of two zinc transporters from rice. *Plant Physiology* 133 (1): 126-134.
- Rengel, Z. 2001.** Genotypic differences in micronutrient use efficiency in crops. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 32 (7-8): 1163-1186.
- Sadeghzadeh, B. 2015.** Soil-zinc application required to improve bread and durum wheat production under cold rainfed conditions. *Iranian Dryland Agronomy Journal* 4 (2): 149-162. (In Persian with English Abstract).
- 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.
- Tiong, J., McDonald, G. K., Genc, Y., Pedas, P., Hayes, J. E., Toubia, J., Langridge, P. and Huang, C. Y. 2014.** *HvZIP7* mediates zinc accumulation in barley (*Hordeum vulgare*) at moderately high zinc supply. *New Phytologist* 201 (1): 131-143.
- Tiong, J., McDonald, G. K., Genc, Y., Shirley, N., Langridge, P. and Huang, C. Y. 2015.** Increased expression of six ZIP family genes by zinc (Zn) deficiency is associated with enhanced uptake and root-to-shoot translocation of Zn in barley (*Hordeum vulgare*). *New Phytologist* 207 (4): 1097-1109.



University of Guilan
Faculty of Agricultural
Sciences

Cereal Research
Vol. 8, No. 3, Autumn 2018 (345-358)

Studying the expression of *ZIP1*, *ZIP3* and *ZIP6* genes in bread wheat under Zn deficiency conditions

Seyyed Mohsen Niazkhani¹, Babak Abdollahi Mandoulakani^{2*}, Morad Jafari³, MirHassan Rasouli-Sadaghiani⁴

Received: July 27, 2017

Accepted: September 27, 2017

Abstract

Zn deficiency in the soil reduces plant yield and grain Zn content. The regulation of ZIP (ZRT/IRT-like protein) family genes is one of the main mechanisms of plant to confront to Zn deficiency stress. To investigate the expression of *ZIP1*, *ZIP3* and *ZIP6* genes in roots and leaves of Zn-efficient and -inefficient wheat cultivars under Zn deficiency conditions, a factorial experiment based on completely randomized design (CRD) with three replications was conducted in greenhouse. Bayat and Niknejad (Zn-efficient) and Hirmand and Karaj 1 (Zn-inefficient) cultivars were grown under Zn deficiency and adequacy conditions and the relative expression of the genes were measured in root and leaf at two growth stages, 28 days after germination (vegetative) and 30% of flowering (reproductive). The results revealed a significant ($P \leq 0.01$) increase in expression of all three studied genes in Zn-efficient than -inefficient cultivars under Zn deficiency conditions. The expression of the *ZIP1* in root was significantly more than that of leaf in both vegetative and reproductive stages, while *ZIP3* and *ZIP6* genes were expressed in both root and leaf. A significant ($P \leq 0.05$) and positive correlation was observed between *ZIP6* expression in leaves and seed grain Zn content at reproductive stage. In conclusion, with regard to the increased expression of *ZIP1* in root and *ZIP3* and *ZIP6* in both root and leaf, it may be resulted that *ZIP1* have a major role in Zn uptake from the roots, while *ZIP3* and *ZIP6* probably involved in Zn uptake and translocation.

Keywords: Grain Zn content, Real time PCR, Zn transporter genes

-
1. Ph. D. Student, Dept. of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
 2. Assoc. Prof., Dept. of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
 3. Assoc. Prof., Dept. of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
 4. Prof., Dept. of Soil Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

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