سطح بیان پروتئین‌های ناقل ZIP1 و ZIP5 در ریشه و برگ سه رقم گندم با روی-کارایی متفاوت

سمیه قاسمی[1*]، امیرحسین خوشگفتارمنش[2]، بدرالدین ابراهیم سید طباطبایی[3] و غزاله خاکسار[3]

[1] گروه علوم خاک، دانشکده منابع طبیعی و کشاورزی، دانشگاه یزد، [2] گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان و [3] گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۱/۱۲ ، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۳/۰۷/۲۲)

چکیده:

توانایی گیاهان برای رشد و تولید عملکرد بالا در خاک‌های با غلظت کم روی، در بین ارقام مختلف گندم متفاوت است، اما تاکنون مکانیسم فیزیولوژی دخیل در زمینه روی-کارایی و همچنین نقش پروتئین‌های ناقل روی در تحمل گیاهان به کمبود روی، به‌طور کامل مشخص نیست. این مطالعه با هدف مقایسه سطح بیان دو پروتیئن ناقل روی و فعالیت آنزیم کاتالاز در ارقام مختلف گندم، در شرایط کمبود روی انجام شد. سه رقم گندم با روی-کارایی متفاوت شامل بک‌کراس (روی-کارا)، کویر (روی-ناکارا) و دوروم (روی-ناکارا) در خاک با غلظت کم روی قابل دسترس (۰/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم) کشت شدند و در مرحله خوشه‌دهی سطح بیان دو ژن ZIP1 و ZIP5، فعالیت آنزیم کاتالاز و غلظت روی در ریشه و برگ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که ژن ZIP1 در ریشه هر سه رقم گندم بیان شد، اما سطح بیان این ژن در ریشه رقم بک-کراس بیشتر از دو رقم دیگر بود. ژن ZIP5 بر خلاف ژن ZIP1، در برگ بیان شد و سطح بیان این ژن در هر سه رقم مشابه بود. غلظت روی در ریشه و برگ رقم بک‌کراس کمتر از ارقام روی-ناکارا بود، اما فعالیت کاتالاز در این رقم به‌طور معنی‌داری بیشتر بود. بر اساس نتایج بدست آمده، یکی از دلایل روی-کارایی ارقام مورد مطالعه ممکن است به علت افزایش سطح بیان ژن ZIP1 در ریشه و در نتیجه انتقال روی از خاک به گیاه باشد.

کلمات کلیدی: ارقام گندم، روی-کارایی، ناقل روی، آنزیم کاتالاز

مقدمه:

کمبود روی در خاک‌های آهکی مناطق خشک و نیمه‌خشک، یکی از عوامل محدود کننده رشد گیاهان می‌باشد (Hacisalihoglu *et al.*, 2003). در ایران تقریباً ۸۰ درصد از زمین‌های زراعی، دچار کمبود روی هستند و با وجود مقدار زیاد روی کل در خاک، به دلیل شرایط ویژه خاک‌ها و وجود مقادیر قابل‌توجه کربنات‌کلسیم، کمبود ماده آلی و بالا بودن pH و شوری، به شکل‌های قابل‌جذب برای گیاه نمی‌باشد و کمبود این عنصر در گیاه بروز می‌کند (Alloway, 2008). توانایی ارقام مختلف گیاهان برای رشد و تولید عملکرد بالا در خاک هایی که دچار کمبود روی می‌باشند، متفاوت است. علت فیزیولوژیکی این تحمل که روی-کارایی (Zinc efficiency) نامیده می‌شود، به‌طور کامل مشخص نشده است. نتایج برخی مطالعات نشان داده‌اند که یکی از مکانیسم‌های روی-کارایی گیاهان مربوط به ترشح ترکیبات کلاته‌کننده روی از قبیل اسیدهای آلی و آمینواسیدها از ریشه می‌باشد

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: s.ghasemi@yazd.ac.ir

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-11-30]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.11.12.0]

(Khoshgoftarmanesh *et al*., 2010). بنابراین، یکی از دلایل اختلاف روی-کارایی غلات در خاک‌های آهکی نیز ممکن است ناشی از تفاوت توانایی این گیاهان در آزادسازی لیگاندهای آلی از ریشه باشد (Rasouli-Sadaghiani *et al*., 2011). این ترکیبات به علت داشتن گروه‌های عامل کربوکسیل و آمین، قادر به کمپلکس کردن کاتیون‌های فلزی از جمله روی هستند (Aravind and Prasad, 2005). کمپلکس شدن عناصر با کلاته کننده‌های آلی، باعث افزایش حلالیت عناصر کم‌مصرف در خاک و همچنین جذب آنها توسط گیاه می‌شود. در این ارتباط Dessureault-Rompre و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که فرآیند کمپلکس شدن روی با آنیون‌های اسیدهای آلی ترشح شده از ریشه *Lupinu salbus* نقش بسیار مهمی در افزایش غلظت این عنصر در محلول ریزوسفر دارد. همچنین Neumann و Romheld (۲۰۰۱) به افزایش حلالیت روی، ناشی از کمپلکس شدن این عنصر با اسیدهای آلی حاصل از ترشحات ریشه گونه‌های گیاهی مختلف اشاره کردند.

یکی دیگر از دلایل تفاوت توانایی گیاهان مختلف در جذب روی، ممکن است مربوط به اختلاف آنها در تعداد و نوع پروتئین‌های ناقل روی در ریشه باشد. در این راستا، Pedas و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که در شرایط کمبود روی، ژن‌های ناقل ZIP3 و ZIP5 در ریشه جو بیان شده و باعث افزایش تحمل گیاه به کمبود روی می‌گردد. همچنین Durmaz و همکاران (۲۰۱۱) مشاهده کردند که سطح بیان ZIP1 در ارقام گندم وحشی متحمل به کمبود روی بیشتر از ارقام حساس به کمبود روی است. نقش مؤثر ژن‌های ناقل ZIP1 و ZIP3 در افزایش تحمل گیاه به کمبود روی، توسط Grotz و همکاران (۱۹۹۸) نیز گزارش شده است.

به نظر می‌رسد گیاهان روی-کارا در شرایط کمبود روی، با افزایش ترشحات ریشه و تشکیل کمپلکس‌های آلی روی و همچنین بیان ژن‌های ناقل روی در ریشه، باعث افزایش جذب روی می‌شوند. از سوی دیگر برخی مطالعات نشان دادند که این گیاهان نه تنها روی را به‌صورت کاتیون دو ظرفیتی بلکه به شکل کلات‌های آلی نیز جذب می‌کنند (Neumann and Romheld, 2001). بنابراین ناقل‌های روی که در روی-کارایی گیاهان مؤثرند ممکن است در جذب کمپلکس‌های آلی روی نیز نقش داشته باشند. در این ارتباط Von-Wiren و همکاران (۱۹۹٦) مشاهده کردند که کلات روی-فیتوسیدروفور در رقم ذرت آهن-کارا از طریق ناقل‌های غشای پلاسمایی دخیل در جذب آهن-فیتوسیدروفور جذب می‌شود. بنابراین، یکی از دلایل روی-کارایی گیاهان، احتمالا مربوط به توانایی گیاه در جذب کمپلکس‌های آلی روی از طریق ناقل‌های مؤثر در روی-کارایی می‌باشد.

روی- کارایی ارقام مختلف گندم در بسیاری از مطالعات مورد بررسی قرار گرفته است (Sing *et al*., 2005). در این ارتباط Khoshgoftarmanesh و همکاران (۲۰۰٤) نشان دادند که گندم کویر و دوروم به عنوان ارقام روی-ناکارا، در شرایط اضافه کردن روی به خاک، تولید ماده خشک بیشتری نسبت به شرایط کمبود روی دارند. در حالی که بک‌کراس به عنوان رقمی روی-کارا، پاسخ کمی به کوددهی روی از خود نشان می‌دهد. با این وجود، اطلاعات زیادی در ارتباط با علت ژنتیکی تفاوت این ارقام در تحمل به کمبود روی، وجود ندارد. لذا در این مطالعه به بررسی سطح بیان دو ژن دخیل در روی-کارایی و همچنین فعالیت آنزیم کاتالاز، در ریشه و برگ سه رقم گندم پرداخته شد.

مواد و روش‌ها:

در این مطالعه فرض بر این است که یکی از دلایل تفاوت روی-کارایی ارقام مختلف گندم، ناشی از اختلاف آنها در سطح بیان ناقل‌های روی باشد. بنابراین، سطح بیان دو ژن ZIP1 و ZIP5، که در تحمل گیاه به کمبود روی نقش دارند، در ریشه و برگ سه رقم گندم با روی-کارایی متفاوت، بررسی شد.

کاشت گیاه: به‌منظور تحریک فعالیت ژن‌های دخیل در روی-کارایی ارقام گندم، خاک مورد مطالعه از ایستگاه تحقیقاتی رودشت با غلظت کم روی تهیه شد (جدول ۱). بذر سه رقم گندم با روی‌کارایی متفاوت شامل دوروم (روی‌ناکارا)، کویر (روی‌ناکارا) و بک‌کراس (روی‌کارا) توسط آب‌اکسیژنه یک درصد ضدعفونی گردید و در گلدان‌هایی حاوی ۳ کیلوگرم خاک، در گلخانه پژوهشی دانشگاه صنعتی اصفهان

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-11-30]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.11.12.0]

جدول ۱- برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد آزمایش

ویژگی	واحد	مقدار
بافت	–	رسی- سیلتی
پ-هاش	–	۷/۷
قابلیت هدایت الکتریکی	دسی‌زیمنس بر متر	۸/۲
کربنات‌کلسیم	درصد	۳۵/۵
کربن‌آلی	درصد	۱/٤
نیتروژن کل	درصد	۰/۱
روی قابل‌جذب	میلی‌گرم بر کیلوگرم	۰/۲
پتاسیم	میلی‌گرم بر کیلوگرم	۳۸/۹
سدیم	گرم بر کیلوگرم	٤/٤
کلسیم	میلی‌اکی‌والان بر لیتر	۰/۰۵
منیزیم	میلی‌اکی‌والان بر لیتر	۰/۰۳

کاشته شدند. در طول دوره داشت، آبیاری با استفاده از آب-مقطر در حد ظرفیت زراعی خاک انجام شد و در مرحله خوشه‌دهی، ریشه و برگ گیاهان به‌طور جداگانه برداشت شدند. برای سنجش آنزیم کاتالاز و سطح بیان پروتئین‌های ناقل از بافت تازه گیاه استفاده شد. برای اندازه‌گیری غلظت روی نیز، نمونه‌های گیاهی در پاکت‌های کاغذی به مدت ٤٨ ساعت در دمای ٦٥ درجه سلسیوس در خشک‌کن قرار گرفته و پس از اندازه گیری وزن خشک ریشه و شاخساره، نمونه‌ها توسط آسیاب پودر شده و در ظروف پلاستیکی دربسته نگهداری شدند.

طراحی آغازگر: طراحی آغازگر از دو ژن دخیل در روی‌کارایی گندم شامل ZIP1 و ZIP5، با استفاده از cds گزارش شده در سایت NCBI انجام شد.

آغازگر طراحی شده ژنZIP1:

zip1-F: 5'- ATG GGC GCC ACC AAT CAT AC -3'
zip1-R: 5'- CCC ATA TGG CAA GCATGG ACA TC -3'

آغازگر طراحی شده ژن ZIP5:

zip5-F: 5'-ATGAAGCCGAGCGCCGCC-3'
zip5-R: 5'- CTA GGC CCA TTT GGC GAG CAT GGA CAT G -3'

استخراج RNA: استخراج RNA کل از ریشه و برگ سه رقم گندم توسط کیت Biozol ساخت شرکت Bioflux ژاپن انجام گردید. مراحل استخراج، طبق روش ارائه شده توسط شرکت سازنده صورت گرفت. مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم نمونه گیاهی با مقدار مناسبی نیتروژن مایع کاملاً پودر گردید. یک میلی‌لیتر بافر استخراج به هر نمونه افزوده و به مدت پنج دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. پس از افزودن مقدار ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به محلول حاصل، به مدت ۱۵ ثانیه به‌آرامی تکان داده شد و به مدت پنج دقیقه روی یخ نگهداری گردید. مخلوط فوق در دمای چهار درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰×g توسط دستگاه Hermle laboratechnik Gmbh مدل Z36HK سانتریفیوژ شد و محلول رویی به ظرف دیگر انتقال یافت. سپس به مقدار هم حجم محلول جدید، ایزوپروپانول سرد اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه روی یخ قرار گرفت. مخلوط حاصل در دمای چهار درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰×g سانتریفیوژ گردید. محلول رویی بیرون ریخته شد و به رسوب باقیمانده یک میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد اضافه گردید. مجدداً نمونه‌ها در دمای چهار درجه سلسیوس به مدت ۸ دقیقه با دور ۷۵۰۰×g سانتریفیوژ گردیده و پس از حذف محلول رویی، رسوب باقیمانده در دمای محیط به مدت ۱۰ دقیقه خشک شد. به‌منظور حل کردن رسوب RNA، ٤٠ میکرولیتر آب تیمار شده با DEPC اضافه و در دمای ٦٠-٥٥ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. در نهایت RNA استخراج شده، در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شد.

تعیین کمیت و کیفیت RNA: به‌منظور تعیین کمیت و کیفیت RNA استخراج شده از دو روش طیف‌سنجی و الکتروفورز ژل آگارز استفاده شد. در روش طیف‌سنجی مقدار RNA و نسبت RNA به پروتئین هر نمونه، توسط دستگاه

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-11-30]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.11.12.0]

بیوفتومتر (Eppendorf AG no 613104423) تعیین گردید. ابتدا دستگاه با آب‌مقطر تیمار شده با DEPC، در عدد صفر تنظیم و پنج میکرولیتر RNA استخراج شده با ۹۵ میکرولیتر آب‌مقطر، رقیق شد. سپس مقدار جذب نوری RNA در طول موج ۲٦۰ نانومتر و همچنین نسبت جذب نور در طول موج ۲٦۰ نانومتر به طول موج ۲۸۰ نانومتر توسط دستگاه طیف‌سنج BECKMAN مدل DU530 اندازه‌گیری شد. در صورتی که مقدار نسبت ذکر شده در محدوده ۲-۱/۸ قرار داشته باشد، بیانگر آن است که RNA از کیفیت مناسبی برخوردار می باشد. مقدار RNA کل در طول موج ۲٦۰ نانومتر با استفاده از رابطه ۱ محاسبه شد.

رابطه (۱)

غلظت RNA (ng/µl)=OD_{260} × ضریب تصحیح دستگاه × Df

در این رابطه، ضریب رقت (Df) ٦۰ و ضریب تصحیح دستگاه ٤۰ در نظر گرفته شد.

در روش الکتروفورز ژل آگارز، مقدار پنج میکرولیتر RNA استخراج شده با یک میکرولیتر بافر بارگذاری مخلوط شده و روی ژل آگارز یک درصد TAE (تریس، اسیداستیک و EDTA) در ولتاژ ثابت ۸۰ ولت به مدت ۳۰ دقیقه الکتروفورز گردید. سپس در اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و در دستگاه Gel document vilber lourmat Tcp–20-M به وسیله پرتو فرابنفش (UV)، باند DNA مورد نظر مشاهده و عکس‌برداری شد.

در این مطالعه کمیت و کیفیت RNA نمونه‌ها با استفاده از دو روش مذکور، اندازه‌گیری گردید و برای هر نمونه با توجه به حجم کل آن، یک میکروگرم RNA بر حسب میکرولیتر محاسبه شد.

تهیه cDNA: تهیه cDNA با استفاده از کیت خریداری شده از شرکت Fermentas و طبق روش توصیه شده توسط شرکت سازنده، انجام شد. برای تکثیر یک قطعه از ژن مورد نظر، به لوله‌های حاوی RNA تیمار شده با DNase، یک میکرولیتر آغازگر zip1-R و zip5-R به‌طور جداگانه اضافه گردید و حجم نهایی مخلوط توسط آب‌مقطر تیمار شده با DEPC به ۱۱ میکرولیتر رسانده شد. مخلوط حاصل به‌مدت پنج دقیقه در دمای ٦۵ درجه سلسیوس نگهداری شده و بلافاصله روی یخ قرار گرفت. سپس برای تکمیل سنتز cDNA، مقادیر مورد نیاز از بافر آنزیم ترانسکریپتاز، dNTP، RNase Inhibitor و آنزیم ترانسکریپتاز به هر نمونه اضافه و به مدت یک ساعت در دمای ٤۲ درجه سلسیوس قرار داده شدند. سپس cDNA ساخته شده در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری گردید.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (RT-PCR): واکنش RT-PCR در مورد ژن *zip1* توسط جفت آغازگر اختصاصی zip1-F و zip1-R و در مورد ژن *zip5* توسط جفت آغازگر zip5-F و zip5-R انجام شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر ساخت شرکت Bio Rad آمریکا انجام گرفت. محصول PCR روی ژل آگارز یک درصد TAE در ولتاژ ثابت ۸۰ ولت به مدت ٤۵ دقیقه الکتروفورز گردید. پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید، در دستگاه Gel documentation از باند مورد نظر عکس‌برداری شد.

آنزیم کاتالاز: برای سنجش آنزیمی از برگ تازه گیاه استفاده شد. مقدار ۰/۲۵ گرم نمونه گیاهی در نیتروژن مایع آسیاب و ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات‌سدیم ۵۰ میلی‌مولار (pH= ۷/۸) حاوی ترایتون (w/v ۱٪) به آن اضافه شد. نمونه‌ها به مدت یک ساعت در دمای ٤ درجه سلسیوس در یخچال نگهداری شدند. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در دمای چهار درجه سلسیوس با دور g × ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ گردیدند. محلول صاف رویی استخراج و برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز استفاده شد (Kang *et al.*, 2003).

فعالیت آنزیم کاتالاز طبق روش Cakmak و Marschner (۱۹۹۲) با کمی تغییر اندازه‌گیری شد. کل حجم مخلوط به کار رفته برای اندازه‌گیری فعالیت کاتالاز (۳ میلی‌لیتر) شامل بافر فسفات‌سدیم ۵۰ میلی‌مولار (pH= ۷/۰) و پراکسید هیدروژن ۱۰ میلی‌مولار بود. واکنش با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر محلول آنزیمی استخراج شده شروع شد و فعالیت آنزیم با ناپدید شدن پراکسید هیدروژن در ۷۰ ثانیه در طول موج ۲٤۰ نانومتر توسط دستگاه طیف‌سنج اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم کاتالاز بر حسب میکرومولار آب اکسیژنه تجزیه شده بر گرم وزن مرطوب در دقیقه بیان شد.

غلظت روی: به منظور اندازه‌گیری غلظت روی ریشه و

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-11-30]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.11.12.0]

شاخساره، مقدار ۰/۲ گرم از نمونه آسیاب شده به داخل تیوب هضم انتقال داده و ۵ میلی‌لیتر اسیدنیتریک غلیظ به آن اضافه شد. پس از قرارگیری نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط، ۲ میلی‌لیتر آب‌اکسیژنه و ۳ میلی‌لیترآب دیونیزه به آنها اضافه و به مدت ٤٠ دقیقه در دستگاه مایکروویو مدل CEM Crop Matters, NCXP 1500 plus Teflon- PFA هضم شدند. پس از صاف‌کردن نمونه‌های هضم شده توسط کاغذ صافی واتمن ٤٢، عصاره حاصل به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد و غلظت روی توسط دستگاه جذب‌اتمی (Ray Leigh wfx-210) تعیین گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه رقم گندم در ۳ تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون LSD در سطح ۵ درصد انجام گردید.

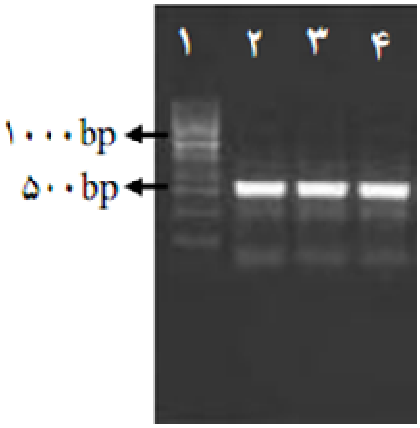
نتایج و بحث:

استخراج RNA کل ازگندم: کمیت و کیفیت RNA کل از گیاهان گندم نشان می‌دهد (شکل ۱) که استخراج RNA با موفقیت انجام شده و برای تهیه cDNA و جداسازی ژن‌های مورد مطالعه در این گیاه مناسب می‌باشد.

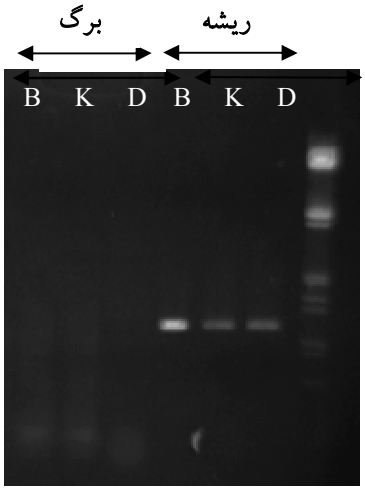
ناقل‌هایی که در جذب و توزیع روی در گیاه نقش دارند به‌طور عمده شامل پروتئین‌های خانواده ZIP و CDF هستند. ناقل‌های خانواده ZIP در جذب روی از خاک و انتقال آن از بیرون سلول به داخل سیتوپلاسم نقش دارند، در حالی‌که ناقل های خانواده CDF باعث انتقال روی از سیتوپلاسم به خارج از سلول می‌گردند (Durmaz *et al.*, 2011). تعداد و نوع پروتیئن‌های ناقل روی در ریشه بسته به نوع و رقم گیاه و وضعیت تغذیه روی متفاوت است (Pedas *et al.*, 2009). مطالعات نشان داده‌اند که در شرایط کمبود روی ژن‌هایی از قبیل ZIP1، ZIP3، ZIP4 و ZIP5 در ریشه و برگ برخی گیاهان بیان شده و باعث افزایش تحمل گیاه به کمبود روی می‌گردد (Durmaz et al., 2011). نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که ژن ZIP1 در ریشه هر سه رقم گندم بیان شد، اما سطح بیان این ژن در ریشه رقم بک‌کراس بیشتر از دو رقم دیگر بود (شکل ۲). در این اتباط Durmaz و همکاران (۲۰۱۱) با بررسی الگوی بیان پروتئین ZIP1 در ریشه و شاخساره گونه-های مختلف گندم وحشی در غلظت‌های مختلف روی مشاهده کردند که با کاهش غلظت روی، سطح رونویسی ZIP1 در تمام گونه‌ها افزایش یافت. همچنین، Grotz و همکاران (۱۹۹۸) نشان دادند که در شرایط کمبود روی، ژن‌های ZIP1 و ZIP3 نقش بسیار مهمی در انتقال روی از خاک به درون گیاه دارند. آنها بیان داشتند که این ژن‌ها اغلب در ریشه گیاهان رشد یافته در شرایط کمبود روی بیان شده و بیان آنها در ریشه گیاهان تغذیه شده با روی کافی و همچنین شاخساره تمام گیاهان، صرف‌نظر از وضعیت روی، بسیار کم است که با نتایج این مطالعه کاملاً مطابقت دارد. افزایش سطح بیان ژن‌های دخیل در روی-کارایی گیاهان، نشان‌دهنده نقش مهم این ژن‌ها در تغذیه روی است. همچنین این ژن‌ها می‌توانند تأثیر بسیار زیادی بر افزایش عملکرد غلات کشت شده در خاک‌های با مقدار کم روی قابل دسترس، داشته باشند (Pedas *et al.*, 2009). نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که رشد رقم بک‌کراس بیشتر از رقم کویر و دوروم بود (شکل ۳). در مطالعه انجام شده توسط Khoshgoftarmanesh و همکاران (۲۰۰٤) نیز مشخص شد که رقم بک‌کراس به عنوان یک رقم روی–کارا، توانایی بیشتری برای رشد و تولید عملکرد بالا در خاک‌هایی که دچار کمبود روی می‌باشند، دارد.

نتایج این مطالعه نشان داد که ژن ZIP5 بر خلاف ژن ZIP1، در برگ هر سه رقم گندم بیان شد و سطح بیان این ژن در ارقام مورد مطالعه، مشابه بود (شکل ٤). بیان ژن ZIP5 در برگ گیاهان بیانگر نقش این ناقل در انتقال روی بین اندام‌های مختلف گیاه می‌باشد. در مطالعه‌ای Ishimaru و همکاران (۲۰۰۵) مشاهده کردند که در شرایط کمبود روی، سطح بیان ZIP4 در ریشه و برگ برنج افزایش یافت و نسخه‌برداری ZIP4 در ریشه و برگ بیشتر از نسخه‌برداری ZIP1 و ZIP3 بود. این محققان گزارش کردند که بیان ZIP1 و ZIP3 در ریشه گیاهان در شرایط کمبود روی، بیانگر نقش این ناقل‌ها در انتقال

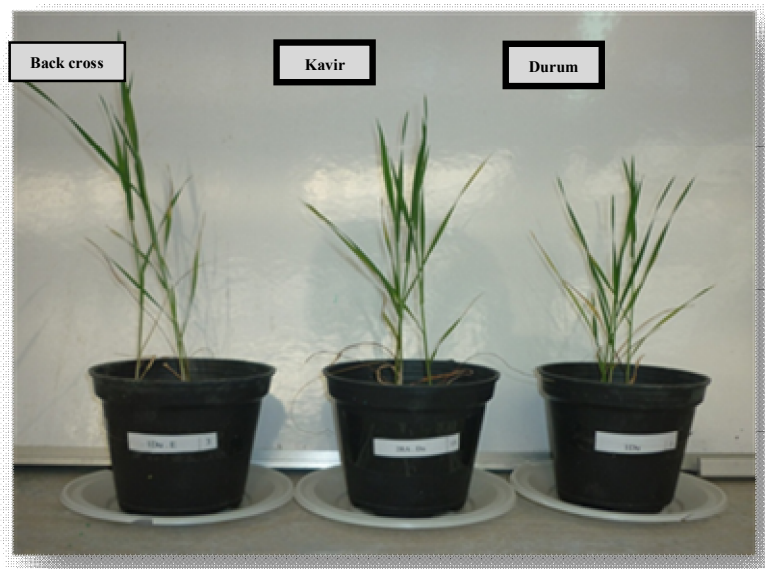
[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-11-30]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.11.12.0]



شکل ۱- استخراج RNA کل گندم ۱) نشانگر اندازه ۱۰۰۰، ۲) رقم بک‌کراس، ۳) رقم کویر و ٤) رقم دوروم



شکل ۲- بیان ژن zip1 در ریشه و برگ سه رقم گندم B) بک‌کراس، K) کویر و D) دوروم



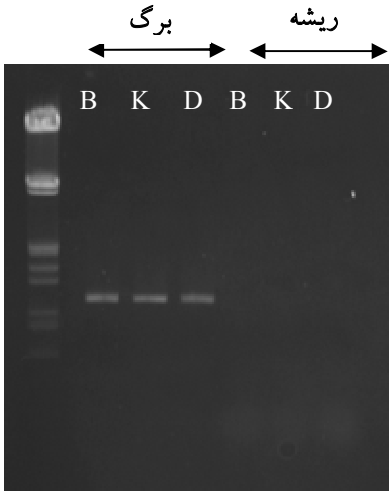
شکل ۳- رشد سه رقم گندم با روی-کارایی متفاوت در شرایط کمبود روی

روی از خاک به گیاه می‌باشد، در حالی‌که ZIP4 در ریشه و برگ بیان شده و روی را بین اندام‌های مختلف گیاه انتقال می‌دهد.

بر اساس نتایج این مطالعه، به‌نظر می‌رسد یکی از دلایل روی-کارایی گیاهان، مربوط به بیان ژن ZIP1 در ریشه و در

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-11-30]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.11.12.0]



شکل٤- بیان ژن zip5 در ریشه و برگ سه رقم گندم B) بک‌کراس، K) کویر و D) دوروم

نتیجه انتقال روی از خاک به گیاه باشد. از سوی دیگر با توجه به این که در شرایط کمبود روی، گیاهان روی-کارا با آزادسازی لیگاندهای آلی از ریشه باعث تشکیل کمپلکس‌های آلی روی می‌شوند، این احتمال وجود دارد که ناقل ZIP1 از طریق ایجاد امکان جذب مستقیم کمپلکس‌های آلی روی توسط ریشه، باعث روی-کارایی شود. زیرا توانایی گیاهان برای جذب و انتقال کمپلکس‌های آلی روی، یکی دیگر از دلایل تحمل گیاهان به کمبود روی است. در این راستا، Von-Wirén و همکاران (۱۹۹٤) گزارش کردند که آهن-کارایی برخی ارقام ذرت ناشی از وجود سیستم جذب کمپلکس آهن-فیتوسیدروفور در گیاه است. آنها نشان دادند که جذب و انتقال آهن در گیاهان آهن-کارا ۲۰ برابر بیشتر از گیاهان آهن-ناکارا می‌باشد. همچنین، Brown و Bell (۱۹٦۹) بیان داشتند که در شرایط کمبود آهن، آزاد شدن پروتون‌ها و ترکیبات احیاکننده از ریشه ارقام مختلف ذرت نقش زیادی در پاسخ گیاه به کمبود آهن ندارد و علت اصلی تفاوت گیاهان در آهن-کارایی مربوط به توانایی آنها در جذب کلات‌های آلی آهن است. نتایج تحقیقات آنها نیز نشان داد که جذب آهن از کمپلکس آهن-N اتیلن‌دی‌نیتریلوتری‌استیک‌اسید در ارقام ذرت آهن‌کارا در مقایسه با ارقام آهن-ناکارا بیشتر بود. در مطالعه انجام شده توسط Daneshbakhsh و همکاران (۲۰۱۳) نیز مشخص شده است که روی-کارایی سه رقم گندم بک‌کراس، کویر و دوروم با میزان فیتوسیدروفور ترشح شده از ریشه این گیاهان مرتبط است. برخی مطالعات نیز نشان داده‌اند که غلظت فیتوسیدروفور ترشح از ریشه ارقام مختلف ذرت با آهن-کارایی متفاوت، یکسان است، اما ارقام آهن-ناکارا در مقایسه با ارقام آهن-کارا قادر به جذب آهن کمپلکس شده با فیتوسیدروفور نمی‌باشند. مقدار آزادسازی فیتوسیدروفور از ریشه نمی‌تواند بیانگر آهن-کارایی باشد، بلکه توانایی برای جذب کمپلکس آهن-فیتوسیدروفور باعث آهن-کارایی می شود (Von-Wiren *et al.*, 1994).

غلظت روی ریشه و برگ: تأثیر نوع رقم گندم بر غلظت روی ریشه در سطح آماری ۰/۱ درصد و بر غلظت روی برگ در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین غلظت روی ریشه مربوط به رقم کویر است و از این نظر اختلاف معنی‌داری بین رقم بک کراس و دوروم وجود ندارد (جدول ۳). غلظت روی برگ نیز در رقم دوروم به‌طور معنی‌داری بیشتر از رقم بک‌کراس و کویر بود. همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، رقم بک‌کراس به عنوان یک رقم روی-کارا توانایی بیشتری برای رشد و تولید عملکرد بالا در خاک‌هایی که دچار کمبود روی می‌باشند، دارد. بنابراین علت کمتر بودن غلظت روی در ریشه و برگ رقم بک‌کراس در مقایسه با دو رقم دیگر ممکن است ناشی از افزایش عملکرد رقم بک‌کراس و در نتیجه ایجاد اثر رقت باشد. برخی محققان نیز مشاهده کردند که روی-کارایی ارقام مختلف گندم با غلظت روی دانه همبستگی ندارد. در این

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-11-30]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.11.12.0]

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس صفات اندازه‌گیری شده در ارقام مختلف گندم

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		غلظت روی ریشه	غلظت روی برگ	فعالیت کاتالاز ریشه	فعالیت کاتالاز برگ
رقم گندم	۲	۱٤۳۲/٤۹ ***	۸۸/۳۵ *	۰/۲٦٦۸ ***	۳/۵۷٦ ***
خطای آزمایش	٦	۱۵۹/۵۹	۵٤/۰۷	۰/۰۱۳۹	۰/۳۰٦۷

*، *** به ترتیب بیانگر معنی‌دار بودن در سطح آماری ۰/۰۵ و ۰/۰۰۱ می‌باشند.

جدول ۳- غلظت روی و فعالیت کاتالاز ریشه و برگ سه رقم گندم با روی-کارایی متفاوت

رقم گندم	غلظت روی ریشه	غلظت روی برگ	فعالیت کاتالاز ریشه	فعالیت کاتالاز برگ
	mg kg^{-1} DW		μ mol g^{-1} FW min^{-1}	
بک‌کراس	۵۳/٦ b*	۱۸/۹ b	۲/۲۹ a	۳/۸۰ a
کویر	۷۵/۱ a	۱۸/۲ b	۲/۰۵ b	۲/۷۳ b
دوروم	٤۵/۱ b	۲۵/۲ a	۱/۸۷ c	۲/۳۰ b

* میانگین‌های با حروف یکسان در هر ستون دارای تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد آزمون LSD نمی‌باشند.

راستا، نتایج مطالعات Peleg و همکاران (۲۰۰۸) برای ارقام گندم وحشی و Cakmak و همکاران (۲۰۰۱) برای گندم دوروم نشان داد که غلظت روی نمی‌تواند شاخص قابل اعتماد برای ارزیابی تفاوت روی-کارایی بین ارقام مختلف باشد.

فعالیت کاتالاز ریشه و برگ: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تأثیر نوع رقم گندم بر فعالیت کاتالاز ریشه و برگ در سطح آماری ۰/۱ درصد معنی‌دار است (جدول ۲). بر اساس نتایج مقایسه میانگین‌ها، فعالیت کاتالاز ریشه به ترتیب در رقم بک‌کراس، کویر و دوروم بیشتر بود (جدول ۳). فعالیت کاتالاز برگ نیز در در رقم بک‌کراس به‌طور معنی‌داری بیشتر از دو رقم دیگر بود. به‌طور کلی نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم مورد مطالعه در ریشه و برگ گندم روی-کارا بیشتر از ارقام روی-ناکارا است. بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که برای ارزیابی وضعیت تغذیه‌ای روی گیاهان، شاخص‌های زیست‌شیمیایی نظیر فعالیت آنزیم‌های حاوی روی، در مقایسه با غلظت کل روی، قابل اعتمادتر می‌باشند. روی یکی از عناصر ضروری در سیستم‌های آنزیمی گیاه بوده و باعث حفظ ساختار فضایی و بهبود فعالیت آنزیم‌ها می‌شود. در مطالعات متعدد نیز مشاهده شده است که فعالیت آنزیم‌هایی نظیر کاتالاز و سوپراکسیددیسموتاز، شاخص بهتری برای بیان وضعیت تغذیه روی در گیاه می‌باشد (Lopez-Millan *et al.*, 2005). در این ارتباط، Hacisalihoglu و همکاران (۲۰۰۳) مشاهده کردند که همبستگی مثبت و معنی‌داری بین روی‌کارایی گیاهان و فعالیت آنزیم‌های حاوی روی در گندم وجود دارد. همچنین این محققان بیان داشتند که کاهش فعالیت آنزیم سوپراکسید-دیسموتاز در شرایط کمبود روی، ناشی از نقش مستقیم روی در بیان ژن و ساخت پروتئین‌ها می‌باشد. تأثیر کمبود روی بر کاهش فعالیت آنزیم‌های وابسته به روی و کاهش وزن‌خشک گندم و برنج نیز توسط Rengel (۱۹۹۵) گزارش شده است.

نتیجه‌گیری کلی:

نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که افزایش سطح بیان ژن ZIP1 در ریشه بک‌کراس به عنوان رقم روی-کارا، می‌تواند باعث انتقال روی از خاک به گیاه و در نتیجه افزایش تحمل گیاه به کمبود روی شود. بهبود رشد و عملکرد و افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز ریشه و برگ رقم بک‌کراس در مقایسه با رقم کویر و دوروم نیز ممکن است ناشی از نقش مهم این ژن در تغذیه روی باشد. بنابراین، افزایش سطح بیان ناقل‌های روی، می‌تواند به عنوان راهکاری جهت بهبود روی-کارایی و افزایش عملکرد و کیفیت گندم در خاک‌های با مقدار کم روی قابل دسترس، مورد توجه قرار گیرد. لذا، ارزیابی‌های بعدی جهت بررسی امکان افزایش سطح بیان ژن

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-11-30]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.11.12.0]

ZIP1 برای بهبود روی-کارایی ارقام حساس به کمبود روی توصیه می‌شود.

منابع:

Alloway, B. J. (2008) Zinc in Soils and Crop Nutrition. 2nd Ed. IZA and IFA Brussels, Belgium and Paris, France.

Aravind, P. and Prasad, M. N. V. (2005) Cadmium-induced toxicity reversal by zinc in *ceratophyllum demersum* L. (a free floating aquatic macrophyte) together with exogenous supplements of amino- and organic acids. *Chemosphere* 61: 1720-1733.

Brown, J. C. and Bell, W. D. (1969) Iron uptake dependent upon genotype of corn. Soil Science Society of America, Proceeding 33: 99-101.

Cakmak, I. and Marschner, H. (1992) Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascrobate peroxidase, and glutathione reductase in bean leaves. Plant Physiology 98: 1222-1227.

Cakmak, O., Ozturk, L., Torun, B., Ozkan, H., Kaya, Z. and Cakmak, I. (2001) Tolerance of 65 durum wheat genotypes to zinc deficiency in a calcareous soil. Journal of Plant Nutrition 24: 1831–1847.

Daneshbakhsh, B., Khoshgoftarmanesh, A. H., Shariatmadari, H. and Cakmak, I. (2013) Phytosiderophore release by wheat genotypes differing in zinc deficiency tolerance growth with zinc free nutrient solution as affected by salinity. Journal of Plant Physiology 170: 41-46.

Dessureault-Rompre, J., Nowack, B., Schulin, R., Tercier-Waeber, M. L. and Luster, J. (2008) Metal solubility and speciation in the rhizosphere of *lupinus albus* cluster roots. Environmental Science and Technology 42: 7146-7151.

Durmaz, E., Coruh, C., Dinler, G., Grusak, M. A., Peleg, Z., Saranga, Y., Fahima, T., Yazici, A., Ozturk, L. and 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: 582–596.

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 of the United States of America 95: 7220–7224.

Hacisalihoglu, G., Hart, J. J., Wang, Y. H., Cakmak, I. and Kochian, L. V. (2003) Zinc efficiency is correlated with enhanced expression and activity of zinc-requiring enzymes in wheat. Plant Physiology131:595–602.

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: 3207-3214.

Kang, G., Wang, C. Sun, G. and Wang, Z. (2003) Salicylic acid changes activities of H_2O_2-metabolizing enzymes and increases the chilling tolerance of banana seedlings. Environmental and Experimental Botany 50: 9-15.

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.

Khoshgoftarmanesh, A. H., Shariatmadari, H., Kalbasi, M. and Karimian, N. A. (2004) Zinc efficiency of wheat cultivars grown on a saline calcareous soil. Journal of Plant Nutrition 27:1953–1962.

Lopez-Millan, A. F., Ellis, D. R. and Grusak, M. A. (2005) Effect of zinc and manganese supply on the activities of superoxide dismutase and carbonic anhydrase in *Medicago truncatula* wild type and *raz* mutant plants. Plant Science 168: 1015-1022.

Neumann, G. and Romheld, V. (2001) The release of root exudates as affected by the plants physiological status. In: The Rhizosphere: Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface (eds. Pinto, R., Varanini, Z. and Nannipieri, P.) Pp. 41–93. New York, Marcel Dekker.

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: 377–383.

Peleg, Z., Saranga, Y., Yazici, A. M., Fahima, T., Ozturk, L. and Cakmak, I. (2008) Grain zinc, iron and protein concentrations and zinc-efficiency in wild emmer wheat under contrasting irrigation regimes. Plant and Soil 306: 57–67.

Rasouli-Sadaghiani, M. H., Sadeghzadeh, Sepehr, B. E. and Rengel, Z. (2011) Root exudation and zinc uptake by barley genotypes differing in Zn efficiency. Journal of Plant Nutrition 34: 1120–1132.

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

Singh, B., Senthil Kumar, A. N., Singh, B. K. and Usha, K. (2005) Improving zinc efficiency of cereals under zinc deficiency. Current Science 88: 36-44.

Von-Wiren N., Marschner, H. and Romheld, V. (1996) Roots of iron-efficient maize also absorb phytosiderophore-Chelated zinc. Plant Physiology 111: 1119-1125.

Von-Wirén, N., Mori, S., Marschner, H. and Romheld, V. (1994) Iron inefficiency in maize mutant ysl (*Zea mays* 1. cv Yellow-Stripe) Is caused by a defect in uptake of iron phytosiderophores. Plant Physiology 106: 71-77.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-11-30]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.11.12.0]