



<https://ijpb.ui.ac.ir/?lang=en>

IRANIAN JOURNAL OF PLANT BIOLOGY

E-ISSN: 2322-2204

Vol. 14, Issue, No. 3, Autumn 2022

Document Type: Research Paper

Received: 07/11/2022

Accepted: 28/01/2023

## The Effect of Iron Deficiency on the Expression of Genes Encoding Carbonic Anhydrase, Peroxidase and Glutathione S-transferase Enzymes in Bread Wheat

Masoumeh Dousti, Babak Abdollahi Mandoulakani\* 

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

### Abstract

Wheat is the main source of carbohydrates and food source for human consumption. During growth period, it faces with various environmental stresses, including low micronutrients stress such as iron. One of the plant strategies to deal with environmental stresses, is the use of enzymatic antioxidant defense system. To investigate the effect of iron deficiency stress on the expression of genes carbonic anhydrase (CAR), peroxidase (PRX) and glutathione S-transferase (GTS) in Fe-efficient (Pishtaz) and -inefficient (Falat) bread wheat cultivars, a factorial greenhouse experiment was implemented in a completely randomized design with three replications. Cultivars were planted at two levels of iron: 1.4 (iron deficiency) and 10 milligrams of Fe per kilogram of soil (sufficient iron), and leaves and roots of the plants were sampled at two stages, one month after germination (vegetation) and 30% of heading (reproduction). The relative expression level of the mentioned genes was measured in the leaves and roots of the cultivars using Real time PCR technique. Results revealed the highest increase in carbonic anhydrase expression in iron deficiency conditions in the roots of Fe-inefficient cultivar (Falat) at vegetative stage, while the highest increase in the expression of peroxidase and glutathione S-transferase genes were observed in the leaves and roots of the Fe-efficient cultivar at the vegetative and reproductive stages, respectively, under iron deficiency conditions. Therefore, the increased expression of the genes encoding peroxidase and glutathione S-transferase enzymes in Fe-efficient cultivar shows that these cultivars use antioxidant enzymes more effectively to deal with soil iron deficiency stress.

---

\* Corresponding Author: b.abdollahi@urmia.ac.ir



## **Introduction**

Wheat is the main source of carbohydrates and the most important source of food for human consumption. The plant faces various environmental stresses, including micronutrient deficiency stress, such as iron. One of the plant strategies to deal with environmental stresses is the use of an enzymatic antioxidant defense system. Peroxidase and glutathione S-transferase are antioxidant enzymes that plants use to deal with environmental stress. Peroxidase enzymes are a large group of iron-containing proteins that participate in electron transfer from biological membranes and oxidative reactions (Vlasits et al., 2010). These enzymes play a role in removing all kinds of oxidizing agents and free radicals produced under stress conditions. Plant peroxidases are the only class III peroxidase enzymes that work in the extracellular space to inhibit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced damage (Glusac et al., 2019). Glutathione S-transferases are multifunctional enzymes with multiple substrates, which enable them to catalyze a wide range of reactions. These enzymes are used as hormones carrier, secondary metabolites, and other enzymes. In addition, these enzymes play a significant role in tolerance to biotic / abiotic stresses and regulation of intracellular homeostasis (Hernandez et al., 2020).

## **Materials and Methods**

To investigate the effect of iron deficiency stress on the expression of genes encoding carbonic anhydrase, peroxidase, and glutathione S-transferase enzymes in iron-efficient (Pishtaz) and -inefficient (Falat) bread wheat cultivars, a factorial greenhouse experiment was carried out in a completely randomized design (CRD) with three replications. Cultivars were planted at two levels of iron: 1.4 (iron deficiency) and 10 (iron sufficiency) mg/kg soil, and leaves and roots of the plants were harvested in two stages, one month after germination (vegetation) and 30% of heading (reproduction). The relative expression level of the mentioned genes was measured in the leaves and roots of the cultivars using the Real-time PCR technique under iron deficiency conditions compared to the control conditions. The actin gene was used as a reference gene to normalize the data. After the Real-time PCR reactions, the melting curve analysis was implemented for each gene to ensure the specificity of the amplified products. Also, the specificity of the products was confirmed using agarose gel analysis. Then, the threshold cycle was extracted from the amplification curves using Rotor-Gene Q software, and the relative expression level of the genes was calculated using the  $\Delta\Delta CT$  method (Pfaffi, 2001). The normality of the residuals and gene expression data was tested using the Kolmogorov-Smirnov method implemented in MINITAB 19 software, and then data were subjected to analysis of variance. The comparison of the means was performed using the SNK test in SAS 2.9.

## **Results and Discussion**

The results revealed the highest increase in carbonic anhydrase expression in the roots of the Fe-inefficient cultivar in the vegetative stage under iron deficiency conditions. Also, the expression level of this gene in the roots of this cultivar in the vegetative stage was significantly higher than that of Fe-efficient cultivar. No significant difference was observed between the expression levels of this gene in the leaves of two cultivars in the vegetative stage and in the roots and leaves of both cultivars in the reproductive stage. The highest increase in the expression of peroxidase and glutathione S-transferase genes under iron deficiency conditions was found in the leaves and roots of the Fe-efficient


cultivar, respectively, in the vegetative and reproductive stages. Also, the level of expression of the glutathione S-transferase gene in the leaves of the Fe-efficient cultivar in the vegetative stage and the roots of the same cultivar in the reproductive stage had a significant difference compared to the leaves and roots of the Fe-inefficient cultivar. Oxidative stress caused by increasing in the level of reactive oxygen species in iron deficiency conditions can lead to damage to cellular components such as proteins, DNA, and membrane lipids. Plants have developed antioxidant systems to deal with oxidative stress and regulate the levels of reactive oxygen species under stress conditions, which includes some antioxidant enzymes such as peroxidase and glutathione S-transferase. (Hernandez and Rodriguez, 2020).

### **Conclusion**

The results of the current investigation revealed the highest increase in the expression of the carbonic anhydrase gene under iron deficiency conditions in the roots of the Fe-inefficient cultivar (Falat) in vegetative stage, while the highest increase in the expression of peroxidase and glutathione S-transferase genes under iron deficiency conditions was observed in the leaves and roots of the Fe-efficient cultivar in the vegetative and reproductive stages, respectively. Therefore, the increased expression of genes encoding peroxidase and glutathione S-transferase enzymes in Fe-efficient bread wheat cultivars demonstrates that these cultivars use antioxidant enzymes more effectively to deal with soil iron deficiency stress.

**Keywords:** Antioxidant enzymes, bread wheat, carbonic anhydrase, iron deficiency, relative gene expression

## تأثیر کمبود آهن بر بیان ژن‌های کدکننده آنزیم‌های کربنیک آنهیدراز، پراکسیداز و گلوکاتایون اس-ترنسفراز در گندم نان

معصومه دوستی، بابک عبدالهی مندولکانی\* 

گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

### چکیده

گندم منبع اصلی کربوهیدرات و مهمترین منبع غذایی برای مصرف انسان است. این گیاه در دوره رشد خود با تنش‌های محیطی مختلفی از جمله تنش کمبود عناصر کم مصرف مانند آهن مواجه می‌شود. یکی از راهکارهای گیاهان برای مقابله با تنش‌های محیطی، استفاده از سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی آنزیمی است. به منظور بررسی اثر تنش کمبود آهن بر بیان ژن‌های کدکننده آنزیم‌های کربونیک آنهیدراز، پراکسیداز و گلوکاتایون اس-ترنسفراز در ارقام آهن-کارا (پیش‌تاز) و آهن-ناکارا (فلات) گندم نان، یک آزمایش گلخانه‌ای به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد. ارقام پیش‌تاز (آهن-کارا) و فلان (آهن-ناکارا) در دو سطح آهن: ۱/۴ (کمبود آهن) و ۱۰ (کفایت آهن) میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک کشت و نمونه‌برداری از برگ و ریشه گیاهان در دو مرحله یک ماه پس از جوانه‌زنی (رویشی) و ۳۰ درصد سنبله‌دهی (زایشی) انجام شد. میزان بیان نسبی ژن‌های مذکور در برگ و ریشه ارقام با استفاده از روش Real time PCR اندازه‌گیری شد. بر اساس نتایج تجزیه واریانس و مقایسه میانگین تیمارها، بیشترین میزان افزایش بیان ژن کربونیک آنهیدراز در شرایط کمبود آهن در ریشه رقم آهن-ناکارا در مرحله رویشی مشاهده شد در حالی که بیشترین افزایش بیان ژن‌های پراکسیداز و گلوکاتایون اس-ترنسفراز در شرایط کمبود آهن به ترتیب در برگ و ریشه رقم آهن-کارا در مرحله رویشی و زایشی مشاهده شد. بنابراین، افزایش بیان ژن‌های کدکننده آنزیم‌های پراکسیداز و گلوکاتایون اس-ترنسفراز در رقم آهن-کارا گندم نان نشان می‌دهد که این ارقام از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان به طور مؤثرتری برای مقابله با تنش کمبود آهن در خاک استفاده می‌کند.

**واژه‌های کلیدی:** کربونیک آنهیدراز، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، کمبود آهن، گندم نان، بیان نسبی



## مقدمه

گندم (*Triticum aestivum* L.) با بیشترین سطح زیر کشت مهم‌ترین محصول غذایی دنیا بوده که در تغذیه انسان از ارزش غذایی بالایی برخوردار است (Badri *et al.*, 2019). این گیاه مهم‌ترین محصول زراعی جهان به ویژه در کشورهای جهان سوم است و بالاترین سطح زیر کشت را در بین غلات دارد (Costaet *et al.*, 2013). سطح زیر کشت، تولید و عملکرد جهانی گندم بر اساس آمار FAO در سال ۲۰۱۹ به ترتیب حدود ۲۱۵۹۰۱۹۵۸ هکتار، ۷۶۵۷۶۹۶۳۵ تن و ۳۵۴۶/۸ کیلوگرم در هکتار است. همچنین، سطح زیر کشت، تولید و عملکرد گندم در ایران بر اساس آمار FAO در سال ۲۰۱۹ به ترتیب ۸۰۳۵۹۳۷ هکتار، ۱۶۸۰۰۰۰۰ تن و ۲۰۹۰/۶ کیلوگرم در هکتار است (FAO, 2019).

بیشتر محصولاتی که در شرایط مزرعه‌ای کشت می‌شوند، اغلب در معرض تنش‌های مختلف قرار دارند. مجموع این تنش‌های محیطی از تأثیرگذارترین عوامل کاهش دهنده عملکرد محصولات کشاورزی در سراسر جهان هستند (Nakabayashi and Saito, 2015). از جمله تنش‌های غیرزیستی می‌توان به کمبود عناصر کم مصرف در خاک اشاره کرد (Cole *et al.*, 2010). از جمله این عناصر کم مصرف ضروری آهن است که وظایف مهمی در گیاهان بر عهده دارد (Ruiz *et al.*, 2000). این عنصر یکی از فراوان‌ترین عناصر موجود در طبیعت، اما سومین ماده غذایی محدود کننده رشد و عملکرد گیاهان است. علت اصلی آن حلالیت کم آهن به ویژه در خاک‌های آهکی و قلیایی است. آهن در جذب، انتقال و

واکنش شیمیایی در سلول‌های گیاهی با سایر فلزات انتقالی مانند مس، روی و منگنز رقابت می‌کند (Rout and Sahoo, 2015). آهن یک کوفاکتور فعال برای بسیاری از آنزیم‌های ضروری، برای سنتز هورمون‌های گیاهی مانند لیوکسیژناز و ۱-آمینو سیکلوپروپان اسید-۱-کربوکسیلیک اکسیداز است. این عنصر در بیوسنتز و تثبیت کلروفیل شرکت می‌کند و از اجزا جدایی‌ناپذیر سیستم انتقال الکترون تنفسی و فتوسنتزی است. همچنین، آهن به عنوان کوفاکتور در زنجیره‌های انتقال الکترون شرکت می‌کند (Grotz and Guerinot, 2006; Briat *et al.*, 2010). کمبود آهن شایع‌ترین کمبود عناصر کم مصرف در جهان است که تخمین زده می‌شود بیش از ۲ میلیارد نفر را تحت تأثیر قرار دهد (Stoltzfus and Dreyfuss, 1998). در صورت کمبود آهن، کلروفیل به مقدار کافی در سلول‌های گیاهی تشکیل نمی‌شود و برگ‌ها رنگ پریده می‌شوند (Nagajyoti *et al.*, 2010). یکی از آنزیم‌هایی که در شرایط کمبود آهن نقش قابل توجهی بر عهده دارد کربونیک آنهیدراز است. کربونیک آنهیدرازها از متالوآنزیم‌های حاوی یون روی ( $Zn^{2+}$ ) هستند (Supuran *et al.*, 2004). این آنزیم‌ها علاوه بر نقش مهمی که در نقل و انتقال گازهای تنفسی بر عهده دارند در فرآیندهای مهم فیزیولوژیک مانند بیوسنتز تعدادی از اسیدهای آمینه، انتقال یون‌ها، انتقال اسید و باز و بیوسنتز نوکلئوتیدهای پیریمیدین دخالت دارند. فعالیت کاتالیزوری کربونیک آنهیدراز توسط یون فلزی انجام می‌شود به این صورت که روی به عنوان یک کوفاکتور با آب ترکیب شده تا محل کاتالیزوری

می‌کنند (Glusac *et al.*, 2019). گلوکاتایون اس- ترنسفرازها آنزیم‌های چند عملکردی و دارای سوبستراهای متعددی هستند که آنها را قادر می‌سازد طیف وسیعی از واکنش‌ها را کاتالیز کنند. این آنزیم‌ها به عنوان حامل هورمون‌ها، متابولیت‌های ثانویه و سایر آنزیم‌ها استفاده می‌شوند. علاوه بر این، گزارش شده است که این آنزیم‌ها در تحمل تنش‌های زیستی و غیرزنده و همچنین، تنظیم همئوستازی داخل سلولی نقش دارند (Hernandez Estevez *et al.*, 2020). باتوجه به اینکه تاکنون تأثیر کمبود آهن خاک بر بیان ژن‌های کدکننده این آنزیم‌ها در گندم نان مطالعه نشده است، بنابراین هدف از پژوهش حاضر، مطالعه الگوی بیان نسبی ژن‌های کدکننده آنزیم کربونیک آنهیدراز و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان پراکسیداز و گلوکاتایون اس-ترنسفراز در مراحل رویشی و زایشی در ریشه و برگ ارقام گندم نان آهن-کارا و آهن-ناکارا تحت شرایط کمبود آهن است.

## مواد و روش‌ها

### تهیه و کشت ارقام

به منظور انجام این تحقیق، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار در بهار سال ۱۳۹۹ در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه اجرا شد. فاکتور اول شامل دو سطح آهن (کمبود و کفایت آهن به ترتیب ۱/۴ و ۱۰ میلی‌گرم آهن در کیلوگرم خاک)، فاکتور دوم شامل دو رقم گندم آهن-کارا (پیش‌تاز) و آهن-ناکارا (فلات)، فاکتور سوم شامل دو اندام ریشه و

آنزیم را فعال کند. شواهد زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد کمبود روی باعث کاهش محتوای آنزیم کربونیک آنهیدراز در برخی گیاهان می‌شود (Escudero-Almanza *et al.*, 2012) ولی در خصوص تأثیر کمبود آهن بر فعالیت این آنزیم در گیاهان گزارشی وجود ندارد.

رشد، نمو و عملکرد گیاهان تحت تأثیر انواع تنش‌های محیطی بوده که اغلب به ایجاد تنش اسمزی و نهایتاً افزایش تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) منجر می‌شوند. آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی از طریق ساز و کارها و عملکردهای مختلف نقش مهمی در کمک به رشد گیاهان تحت تنش دارند. از جمله این ساز و کارها، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان است که به عنوان بخشی از سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی عمل می‌کنند. این آنزیم‌ها مجموعه پیچیده‌ای از ساز و کارها برای به حداقل رساندن آثار مضر ROS و حذف آنها را تشکیل می‌دهند (Vlasits *et al.*, 2010).

از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی که گیاهان برای مقابله با تنش‌های محیطی استفاده می‌کنند پراکسیداز و گلوکاتایون اس-ترنسفراز است. آنزیم‌های پراکسیداز گروه بزرگی از پروتئین‌های آهن‌دار هستند که در نقل و انتقال‌های الکترونی از غشاهای زیستی و واکنش‌های اکسیداتیو شرکت می‌کنند (Vlasits *et al.*, 2010). این آنزیم‌ها در حذف انواع عوامل اکسید کننده و رادیکال‌های آزاد تولید شده در شرایط تنش نقش دارند (Lopez-Millan *et al.*, 2005). پراکسیدازهای گیاهی تنها آنزیم‌های پراکسیداز کلاس III هستند که در فضای خارج سلولی برای مهار  $H_2O_2$  فعالیت

خاک) و شاهد (۱۰ میلی‌گرم آهن در کیلوگرم خاک) اعمال شد. لازم به توضیح است که مقدار اولیه غلظت آهن خاک، ۱/۴ میلی‌گرم بود که برای تیمار کمبود استفاده شد. سپس آهن همین خاک با کود آهن سکسترین به ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک رسانده شد و به عنوان تیمار کفایت آهن استفاده شد. بذرها از مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر ایران تهیه و پس از ضدعفونی شده با آب اکسیژنه یک درصد، در عمق ۴ سانتی‌متری خاک کاشته شد. ترکیب محلول غذایی که در طول آزمایش به گلدان‌ها داده شد در جدول ۲ آورده شده است.

برگ و فاکتور چهارم نمونه‌برداری در دو مرحله رویشی (یک ماه پس از جوانه زنی) و زایشی (۵۸ روز پس از کشت، ۳۰ درصد سنبله دهی) بود. نمونه‌های ریشه و برگ پس از برداشت در داخل ازت مایع قرار داده شد و سپس به فریز -۸۰ درجه سانتیگراد منتقل شد. خاک مورد استفاده (جدول ۱) از نواحی دارای کمبود آهن از اطراف ارومیه تهیه و پس از انجام آزمایش و اطمینان از کمبود آهن، در گلدان‌های پلی اتیلن به قطر ۱۱ و ارتفاع ۳۴ سانتی‌متر، ۳ کیلوگرم خاک ریخته و تیمار آهن بر اساس حد بحرانی آهن در خاک در دو سطح کمبود آهن (۱/۴ میلی‌گرم آهن در کیلوگرم

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

Table 1- Physical and chemical properties of the soil used in the experiment

| pH   | (ds/m) EC | Sand | Silt | Clay | K (mg/kg) | Fe (mg/kg) | P-Olsen | OC (%) | CCE (%) |
|------|-----------|------|------|------|-----------|------------|---------|--------|---------|
| ۷/۹۸ | ۰/۸۹      | ۳۸   | ۵۳   | ۹    | ۱۶        | ۱/۴        | ۳/۴     | ۰/۶۵   | ۲۲      |

EC: electrical conductivity, OC: organic carbon, CCE: calcium carbonate equivalent

جدول ۲- ترکیب محلول غذایی مورد استفاده در این آزمایش

Table 2- Composition of the nutrient solution used in the study

| عنصر        | مقدار (میلی‌گرم) | کود             | غلظت (میلی‌گرم بر کیلوگرم) |
|-------------|------------------|-----------------|----------------------------|
| نیتروژن (N) | ۳۰               | اوره            | ۶۵/۲۲                      |
| فسفر (P)    | ۵۰               | سوپرفسفات تریپل | ۲۴۹                        |
| پتاسیم (K)  | ۱۰۰              | سولفات پتاسیم   | ۲۲۳                        |
| روی (Zn)    | ۵                | سولفات روی      | ۲۲/۱                       |
| مس (Cu)     | ۵                | سولفات مس       | ۱۹/۶                       |
| آهن (Fe)    | ۱۰               | آهن سکسترین     | ۱۸۲                        |

شرکت سازنده انجام شد. برای ارزیابی کیفیت RNA استخراجی، از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد و نانودراپ استفاده شد. برای سنتز cDNA از کیت RevertAid First Strand cDNA

#### استخراج RNA و سنتز cDNA

استخراج RNA از برگ و ریشه گیاهان با استفاده از محلول استخراج RNX-plus<sup>TM</sup> (سیناکلون، ایران) مطابق دستورالعمل پیشنهادی

ترنسفراز با روش Real time PCR در گیاهان تیمار شده نسبت به شاهد بررسی شد. در این فرآیند از ژن اکتین به عنوان ژن مرجع برای نرمال‌سازی داده‌ها استفاده شد. واکنش Real time PCR طبق دستورالعمل کیت Maxima SYBR Green/Fluorescence qPCR Master Mix(2x) (ThermoFisher Scientific، آمریکا) انجام شد. برنامه حرارتی برای تکثیر ژن‌ها با استفاده از روش Real time PCR، شامل فعال‌سازی اولیه آنزیم در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه بود که در یک چرخه انجام شد. سپس ۴۰ چرخه شامل مراحل واسرشت‌سازی در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای اتصال مربوط به هر ژن (جدول ۳) به مدت ۳۰ ثانیه و بسط در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه انجام شد.

Synthesis (ThermoFisher Scientific، آمریکا) مطابق دستورالعمل پیشنهادی شرکت سازنده استفاده شد. قبل از سنتز cDNA برای حذف DNA ژنومی در نمونه‌های RNA استخراجی، از تیمار DNase (بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده کیت سنتز cDNA) استفاده شد. برای بررسی صحت سنتز cDNA از واکنش‌های کنترل RT (عدم استفاده از آنزیم Reverse transcriptase در واکنش)، NTC (عدم استفاده از RNA در واکنش) و همچنین، از واکنش کنترل مثبت مطابق دستورالعمل کیت سنتز cDNA استفاده شد.

#### بیان ژن

برای بررسی بیان ژن از دستگاه Rotor gene Q-pure Detection-Qiagen مدل ۶۰۰۰ (QIAGEN، آمریکا) استفاده شد. میزان بیان ژن‌های کربونیک آنهیدراز، پراکسیداز و گلوکاتایون اس-

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

Table 3- Characteristics of the primers used in Real time PCR reactions

| نام ژن        | شماره دسترسی | توالی آغازگرها   | دمای اتصال (درجه سانتیگراد) | طول محصول (جفت باز) |
|---------------|--------------|--|-----------------------------|---------------------|
| <i>Actin3</i> | TC234027     | رفت: GACGCACAACAGGTATCGTGTTG<br>برگشت: CAGCGAGGTCAAGACGAAGGATG   | ۶۰                          | ۱۰۷                 |
| <i>CAN</i>    | L36959.1     | رفت: TGATGGGAGTCTTGTGCTTGTG<br>برگشت: TGCTCCACATCGGGGCGTTGAA     | ۶۲                          | ۱۰۷                 |
| <i>PRX</i>    | AB518867.1   | رفت: TGAGTCATGGAGCGAATGCTGGTC<br>برگشت: TGCTGTAGCACTCGCCAAGTGGAA | ۶۴                          | ۱۱۶                 |
| <i>GST</i>    | AF002211.1   | رفت: CGATCTACGCCAACAGGTCGTC<br>برگشت: CACTGGAGTCAAGGTCGGTCAGCA   | ۶۴                          | ۹۰                  |

اکتین (Actin 3)، کربونیک آنهیدراز (CAN)، پراکسیداز (PRX) و گلوکاتایون اس-ترنسفراز (GTS)

Actin (Actin 3), carbonic anhydrase (CAN), peroxidase (PRX) and glutathione S-transferase (GTS)



افزار MINITAB نسخه ۱۹ بررسی و در نهایت تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها با آزمون SNK در نرم افزار SAS نسخه ۹/۲ انجام شد.

### نتایج و بحث

بررسی نتایج حاصل از تجزیه واریانس ژن‌ها (جدول ۴) نشان داد که اثر متقابل سه جانبه رقم × بافت × مرحله نمونه‌برداری بر بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار است. بنابراین، مقایسه میانگین برای تأثیرات متقابل سه جانبه براساس آزمون SNK انجام شد.

پس از اتمام واکنش‌های Real time PCR، منحنی ذوبی هر ژن با افزایش دما از ۴۵ تا ۹۵ درجه سانتیگراد (۰/۵ درجه در هر ثانیه) برای هر کدام از ژن‌ها رسم و درستی تکثیر محصول مربوط به هر ژن با استفاده از منحنی ذوبی مربوط به همان ژن بررسی شد. همچنین، صحت تکثیر محصولات با استفاده از آنالیز ژل آگارز نیز تأیید شد. پس از استخراج چرخه آستانه با نرم افزار Rotor-Gene Q، میزان بیان نسبی ژن‌ها با روش  $\Delta\Delta CT$  محاسبه شد (Pfaffi, 2001). نرمال بودن اشتباهات و داده‌های بیان ژن با روش کلموگراف-اسمیرنوف در نرم

جدول ۴- تجزیه واریانس بیان نسبی ژن‌های کربونیک آنهیدراز، پراکسیداز و گلوکاتایون اس-ترنسفراز تحت شرایط کمبود آهن در ریشه و برگ ارقام آهن-کارا (پیش‌تاز) و آهن-ناکارا (فلات) گندم نان

Table 4- Analysis of variance for relative expression of carbonic anhydrase, peroxidase and glutathione S-transferase genes under soil Fe deficiency conditions in Fe-efficient and -inefficient bread wheat cultivars

| میانگین مربعات         |                  |           |            |                    | منابع تغییرات |
|------------------------|------------------|-----------|------------|--------------------|---------------|
| گلوکاتایون اس-ترنسفراز | کربونیک آنهیدراز | پراکسیداز | درجه آزادی | رقم                |               |
| ۰/۴۰*                  | ۲۹/۱۶**          | ۶/۵۴**    | ۱          | رقم                |               |
| ۲/۳۷**                 | ۱۴/۸۲**          | ۱۱/۵۰**   | ۱          | بافت               |               |
| ۰/۰۰۳ <sup>ns</sup>    | ۲۱/۱۶**          | ۲۱/۲۲**   | ۱          | مرحله              |               |
| ۰/۴۱*                  | ۴۶/۹۲**          | ۲۸/۷۰**   | ۱          | رقم × بافت         |               |
| ۰/۵۵*                  | ۱۸/۴۹**          | ۱۰/۵۱**   | ۱          | رقم × مرحله        |               |
| ۱/۸۳**                 | ۲۰/۷۰**          | ۲۵/۰۷**   | ۱          | بافت × مرحله       |               |
| ۱/۷۹**                 | ۲۱/۶۲**          | ۱۴/۷۶**   | ۱          | رقم × بافت × مرحله |               |
| ۰/۰۶۶                  | ۰/۴۶۷            | ۰/۴۴۱     | ۱۶         | خطای آزمایشی       |               |
| ۲۱/۲۲                  | ۲۹/۷۲            | ۳۵/۹۴     |            | ضریب تغییرات (%)   |               |

<sup>ns</sup>, \*, \*\*: به ترتیب غیرمعنی‌داری و معنی‌داری در سطح احتمال پنج و یک درصد است.

<sup>ns</sup>, \*, \*\*: non significant and significant at 5% and 1% probability levels, respectively

در مرحله رویشی مشاهده شد. همچنین، میزان بیان این ژن در ریشه همین رقم در مرحله رویشی به‌طور معنی‌داری بیشتر از رقم آهن-کارا است. لازم به توضیح است که بین میزان بیان این ژن در دو رقم در برگ در مرحله رویشی و در ریشه و برگ در

### بیان نسبی ژن کربونیک آنهیدراز

بر اساس نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل رقم × بافت × مرحله نمونه‌برداری بر بیان ژن کربونیک آنهیدراز، بیشترین میزان افزایش بیان این ژن در شرایط کمبود آهن در ریشه رقم آهن-ناکارا فلات

چون مرکبات، گوجه فرنگی، گندم و اسفناج در شرایط کمبود روی انجام شده و کاهش بیان کربونیک آنهیدراز در ارقام روی-کارا در شرایط کمبود روی گزارش شده است (Lopez-Millan *et al.*, 2005).

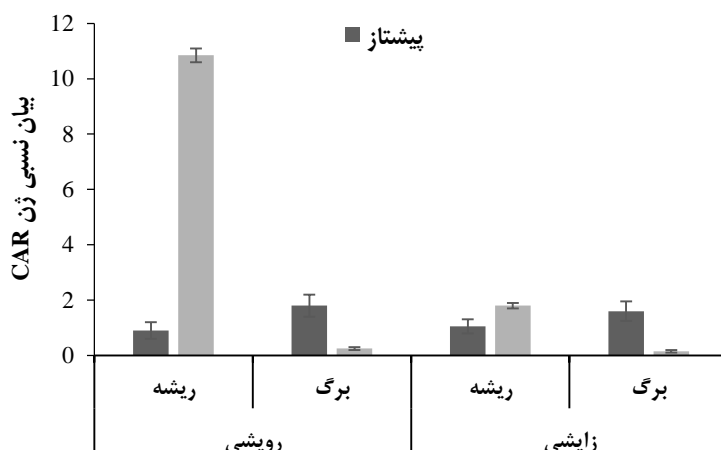
#### بیان نسبی ژن پراکسیداز

مقایسه میانگین تأثیرات متقابل رقم × بافت × مرحله نمونه برداری بر بیان ژن کدکننده آنزیم پراکسیداز نشان داد که بیشترین میزان بیان این ژن به برگ رقم آهن-کارا پیشتر از در مرحله رویشی مربوط بود. همچنین، میزان بیان این ژن در برگ همین رقم در مرحله رویشی به طور معنی‌داری بیشتر از رقم آهن-ناکارا بود. بین میزان بیان این ژن در دو رقم در ریشه در مرحله رویشی، و در ریشه و برگ در مرحله زایشی، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۲). تنش اکسیداتیو ناشی از افزایش ROS می‌تواند به آسیب به اجزای سلولی از جمله پروتئین‌ها، DNA و لیپیدهای غشایی منجر شود. گیاهان برای مقابله با تنش‌های اکسیداتیو و تنظیم سطوح ROS، سیستم آنتی‌اکسیدانی خود را توسعه داده‌اند که این سیستم شامل برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از جمله پراکسیداز است. پراکسیدازهای گیاهی در چرخه فعالیت معمول خود، کاتالیز کننده  $H_2O_2$  هستند، بنابراین، می‌توان چنین بیان کرد که افزایش بیان ژن پراکسیداز در شرایط کمبود آهن در برگ رقم آهن-کارا در مرحله رویشی، احتمالاً به دلیل نقش این آنزیم آنتی‌اکسیدان تأثیرگذار در کنترل ROSها و همچنین، کاهش تأثیرات مضر افزایش پراکسید

مرحله زایشی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۱). کربونیک آنهیدراز آنزیمی است که در جایگاه فعال خود حاوی روی است که یکی از ساده‌ترین و در عین حال مهمترین واکنش‌های فیزیولوژیک که آبدهی برگشت‌پذیر دی‌اکسیدکربن به بیکربنات و پروتون است را کاتالیز می‌کند (Lindskog *et al.*, 1997). بنابراین، افزایش فعالیت آنزیم کربونیک آنهیدراز در شرایط کمبود آهن در ارقام آهن-ناکارا احتمالاً به علت شرکت این آنزیم در فرایندهای انتقالی تبدیل  $CO_2$  به یون‌های بیکربنات و هیدروژن است. فلزات مختلفی می‌توانند به عنوان کوفاکتور برای کربونیک آنهیدراز عمل کنند، همچنین، این فلزات بازدارنده فعالیت و تعدیل‌کننده بیان این ژن نیز هستند. این تنوع را می‌توان با پیچیدگی و جنبه‌های چند وجهی اتصال فلزات با ایزومرهای کربونیک آنهیدراز توضیح داد، که به پاسخ‌های بازدارنده متفاوت به فلزات در بافت‌ها و گونه‌های مختلف منجر می‌شود. همچنین، می‌توان گفت که تفاوت‌های ساختاری در ایزومرهای کربونیک آنهیدراز، احتمالاً باعث اتصال فلزات متفاوت با ایزومرهای مختلف این آنزیم و در نتیجه پاسخ‌های متفاوت می‌شود. افزایش معنی‌دار و قابل توجه بیان این ژن در ریشه رقم آهن-ناکارای فلات در مرحله رویشی نسبت به مرحله زایشی در شرایط کمبود آهن نشان می‌دهد که احتمالاً در ریشه این رقم در مرحله رویشی، عنصری غیر از آهن (مانند روی) به عنوان کوفاکتور این آنزیم عمل می‌کند. مطالعه خاصی روی بیان ژن کربونیک آنهیدراز در شرایط کمبود آهن انجام نشده، اما مطالعات زیادی روی گیاهانی

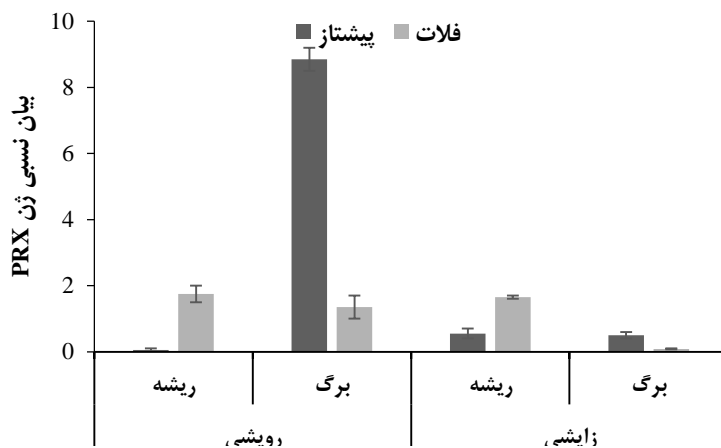
در Fathi. (Sinaha and Saxena, 2006; 2001 گیاه دارویی *Bacops monnieri* L. گزارش کردند که استفاده از آهن سبب افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در ریشه و کاهش فعالیت آن در برگ‌ها می‌شود.

هیدروژن است. در گیاه برنج نیز در شرایط کمبود آهن افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز گزارش شده است. همچنین، در گلرنگ گزارش شده که محلول پاشی آهن، سطح فعالیت آنزیم پراکسیداز را به طور معنی داری افزایش می‌دهد (Ranieri *et al.* )



شکل ۱- مقایسه میانگین اثر متقابل رقم × بافت × مرحله نمونه‌برداری بر بیان نسبی ژن کربونیک آنهیدراز (CAN) در ارقام آهن-کارا (پیشناز) و آهن-ناکارا (فالات) گندم نان در شرایط کمبود آهن (ستون‌هایی که دارای حروف مشترک هستند بر اساس آزمون چند دامنه‌ای SNK اختلاف معنی داری در سطح یک درصد ندارند).

Figure 1- Mean comparison for cultivar × tissue × sampling stage interaction on the relative expression of carbonic anhydrase (CAN) gene in Fe-efficient (Pishtaz) and -inefficient (Falat) bread wheat cultivars under iron deficiency conditions (The columns followed by common letters are not significantly different based on SNK test at %1 probability level).



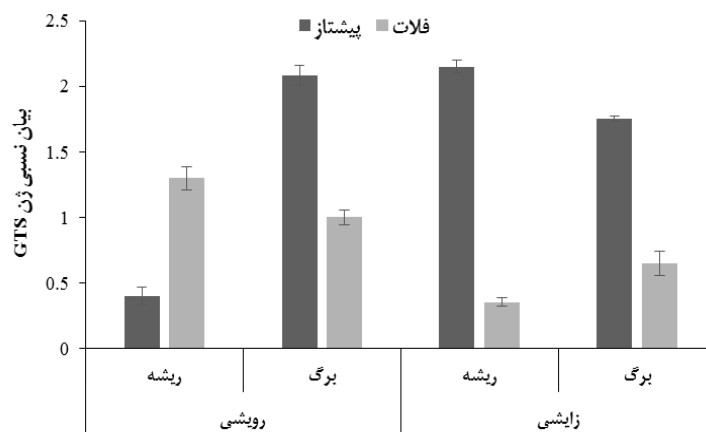
شکل ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل رقم × بافت × مرحله نمونه‌برداری بر بیان نسبی ژن پراکسیداز (PRX) در ارقام آهن-کارا (پیشناز) و آهن-ناکارا (فالات) گندم نان در شرایط کمبود آهن (ستون‌هایی که دارای حروف مشترک هستند بر اساس آزمون چند دامنه‌ای SNK اختلاف معنی دار در سطح یک درصد ندارند).

Figure 2- Mean comparison for cultivar × tissue × sampling stage interaction on the relative expression of peroxidase (PRX) gene in Fe-efficient (Pishtaz) and -inefficient (Falat) bread wheat cultivars under iron deficiency conditions (The columns followed by common letters are not significantly different based on SNK test at %1 probability level).

### بیان نسبی ژن گلوپتاتین اس-ترنسفراز

بر اساس نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل رقم × بافت × مرحله نمونه برداری بر بیان ژن گلوپتاتین اس-ترنسفراز، بیشترین میزان بیان این ژن در برگ رقم آهن-کارا پیشتاز در مرحله رویشی و ریشه رقم آهن-کارا پیشتاز در مرحله زایشی مشاهده شد. همچنین، میزان بیان این ژن در برگ رقم آهن-کارا در مرحله رویشی و ریشه همین رقم در مرحله زایشی اختلاف معنی داری نسبت به برگ و ریشه رقم آهن-ناکارا داشت (شکل ۳). گلوپتاتین اس-ترنسفراز جزء آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی است که نقش کلیدی در واکنش سم زدایی در درون سلول‌ها ایفا می‌کند (Noctor and Foyer, 1998). در این مطالعه هم میزان بیان گلوپتاتین اس-ترنسفراز در شرایط کمبود آهن در مرحله زایشی در ریشه و برگ ارقام آهن-کارا به طور معنی داری

افزایش یافت. این افزایش بیان احتمالاً به علت نقش مهم این آنزیم در مدیریت ROS در شرایط تنش و همچنین، کارایی بالای ارقام آهن-کارا نسبت به ارقام آهن-ناکارا در جذب آهن از خاک در مرحله زایشی است. در تحقیقی که روی گیاه آراییدوپسیس ترا ریخته در شرایط سمیت آلومینیوم و مس انجام شد، مشخص شد که بیان گلوپتاتین اس-ترنسفراز به طور معنی داری در شرایط تنش ناشی از فلزات افزایش می‌یابد (Ezaki *et al.*, 2004). در این مطالعه، کاهش میزان بیان ژن گلوپتاتین اس-ترنسفراز در شرایط کمبود آهن در ریشه رقم آهن-کارا در مرحله رویشی، احتمالاً به دلیل اینکه این رقم از سایر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان برای مقابله با تأثیرات مخرب ROS در مرحله رویشی در ریشه در شرایط کمبود آهن استفاده می‌کند.



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل رقم × بافت × مرحله نمونه برداری بر بیان نسبی ژن گلوپتاتین اس-ترنسفراز (GTS) در ارقام آهن-کارا (پیشتاز) و آهن-ناکارا (فلات) گندم نان در شرایط کمبود آهن (ستون‌هایی که دارای حروف مشترک هستند بر اساس آزمون چند دامنه‌ای SNK اختلاف معنی داری در سطح یک درصد ندارند).

Fig. 1. Mean comparison for cultivar × tissue × sampling stage interaction on the relative expression of glutathione S-transferase (GTS) gene in Fe-efficient (Pishtaz) and -inefficient (Falat) bread wheat cultivars under iron deficiency conditions (The columns followed by common letters are not significantly different based on SNK test at %1 probability level).

and seeding rate on bread wheat yield and test weight under mediterranean conditions. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 25: 951-961.

Escudero-Almanza, D. J., Ojeda-Barrrios, D. L., Hernandez-Rodriguez, O. A., Sanchez-Chavez, E., Ruiz-Anchondo, T. and Sida-Arreola, J. P. (2012) Carbonic anhydrase and zinc in plant physiology. *Chilean Journal of Agricultural Research* 72: 140-146.

Ezaki, B., Suzuki, M., Motoda, H., Kawamura, M., Nakashima, S. and Matsumoto, H. (2004) Mechanism of gene expression of *Arabidopsis* glutathione s-transferase, Atgst1, and Atgst11 in response to aluminum stress. *Plant Physiology* 134:1672-1682.

Fathi, K., Amini, M., Modarres Sanavi, A., Rezazadeh, A. and Heshmati, S. (2011) The effect of soil and foliar application Fe on some biochemical characteristics of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) under two irrigation regimes. *Iranian Journal of Field Crop Science* 42(3): 509-518 (in Persian).

Grotz, N. and Guerinot, M. (2006) Molecular aspects of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 7: 598-608.

Glusac, J., Isaschar-Ovdat, S., Fishman, A. and Kukavica, B. (2019) Partial characterization of bean and maize root peroxidases and their ability to crosslink potato protein. *Archives of Biological Sciences* 71: 293-303.

Hernandez Estevez, I. and Rodriguez Hernandez, M. (2020) Plant glutathione s-transferases: an overview. *Plant Gene* 23 (100233): 1-12.

Lindskog S. (1997) Structure and mechanism of carbonic anhydrase. *Pharmacology and Therapeutics* 74(1):1-20.

## نتیجه‌گیری

به‌طور کلی، بر اساس نتایج تحقیق حاضر، بیشترین میزان افزایش بیان ژن کربونیک آنهیدراز در شرایط کمبود آهن در ریشه رقم آهن-ناکارا فلات در مرحله رویشی مشاهده شد در حالی که بیشترین افزایش بیان ژن‌های پراکسیداز و گلوتاتیون اس-ترنسفراز در شرایط کمبود آهن به ترتیب در برگ و ریشه رقم آهن-کارا پیش‌تاز در مرحله رویشی و زایشی مشاهده شد. بنابراین، افزایش بیان ژن‌های کدکننده آنزیم‌های پراکسیداز و گلوتاتیون اس-ترنسفراز در رقم آهن-کارا گندم نان نشان می‌دهد که این ارقام از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان به‌طور مؤثرتری برای مقابله با تنش کمبود آهن خاک استفاده می‌کند. پیشنهاد می‌شود در ادامه تحقیق حاضر، میزان بیان ژن‌های کدکننده سایر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان تحت تنش کمبود آهن مطالعه و همبستگی بیان این ژن‌ها با محتوای آهن دانه، ریشه و برگ در شرایط کمبود آهن مطالعه شود.

## References

- Badri, H., Mohammadi, R. and Atminan A. R. (2019) Study on adaptability and grain yield stability of durum wheat genotypes. *Journal of Crop Breeding* 12(33): 119-126.
- Briat, J., Rouached, H., Tissot, N., Gaymard, F. and Dubos, C. (2010) Integration of P, S, Fe, and Zn nutrition signals in *Arabidopsis thaliana*: potential involvement of phosphate starvation response 1 (PHR1). *Frontiers in Plant Science* 6: 290: 1-16.
- Costa, R., Pinheiro, N., Ameida, A. S., Gomes, C., Coutinho, J., Costa, A. and Nacas, B. (2013) Effect of sowing date

- 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.
- Nagajyoti, P. C., Lee, K. D. and Sreekanth, T. V. M. (2010) Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters* 8: 199-216.
- Nakabayashi, R. and Saito, K. (2015) Integrated metabolomics for abiotic stress responses in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 24: 10-16.
- Noctor, G. and Foyer, C. H. (1998) Ascorbat and glutatione: keeping active oxygen under control. *Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42: 249-279.
- Pfaffl, M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29(9): 45-45.
- Ranieri, A., Castagna, A., Baldan, B. and Soldatini G. F. (2001) Iron deficiency differently affects peroxidase isoforms in sunflower. *Journal of Experimental Botany* 52: 25-35.
- Ruiz, J. M., Baghour M. and Romero, L. (2000) Efficiency of the different genotypes of tomato in relation to foliar content of Fe and the response of some bioindicators. *Journal of Plant Nutrition* 23: 1777-1786.
- Rout, G. and Sahoo S. (2015) Role of iron in plant growth and metabolism. *Review in Agricultural Science* 3: 1-24.
- Sinaha, S. and Saxena, R. (2006) Effect of iron on lipid peroxidation, and enzymatic and non-enzymatic antioxidant and bacoside A content in medicinal plant *Bacopa monnieri* L. *Chemosphere* 62(8): 134-135.
- Supuran, C. T., Vullo, D., Manole, G., Casini A. and Scozzafava, A. (2004) Designing of novel carbonic anhydrase inhibitors and activators. *Current Medicinal Chemistry Cardiovascular and Hematological agents* 2(1):49-68.
- Vlasits, J., Jakopitsch, C. H., Bernroitner, M., Zamocky, M. and Furtmuller, P. G. (2010) Heme peroxidases, mechanisms of heme peroxidases. *Achieves of Biochemistry and Biophysics*, 500: 74-81.

