دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

"مقاله پژوهشی"

الگوی بیان ژن‌های *NAS1*، *NAS2* و *NAS3* تحت تنش کمبود روی در گندم نان (*Triticum aestivum* L.)

اسماعیل وهبی[۱] و بابک عبدالهی مندولکانی[۲]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه
۲- دانشیار گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه (نویسنده مسوول: b.abdollahi@urmia.ac.ir)
تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۹/۱۸
صفحه: ۱۷۱ تا ۱۷۹

چکیده

به‌منظور مطالعه اثر تنش کمبود روی (Zn) بر بیان سه ژن دخیل در سنتز کلاته‌کننده‌های فلزات (*NAS1*، *NAS2* و *NAS3*) در گندم نان،آزمایش گلخانه‌ای به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد. دو رقم هامون و هیرمند (به‌ترتیب روی-کارا و روی-ناکارا)در شرایط تنش کمبود روی (صفر) و کفایت آن (۵ میلی‌گرم روی در کیلوگرم خاک) کشت و بیان نسبی این ژن‌ها در ریشه و برگ در دو مرحله رشدی، طویل شدن ساقه (مرحله رویشی) و ۳۰ درصد گلدهی (مرحله زایشی) با روش Real time PCR ارزیابی شد. نتایج نشان داد که بیشترین میزان افزایش بیان نسبی ژن‌های *NAS1* (۷ برابر کنترل) و *NAS2* (۵ برابر) در شرایط تنش کمبود روی به‌ترتیب در ریشه رقم روی-کارای هامون در مرحله زایشی و در برگ همین رقم در مرحله رویشی مشاهده شد. بیشترین میزان افزایش بیان ژن *NAS3* (۷ برابر کنترل) نیز در شرایط کمبود روی در ریشه رقم روی-کارای هامون در مرحله زایشی مشاهده شد. در برگ نیز بیان این ژن در مرحله زایشی در شرایط کمبود روی در هر دو رقم افزایش یافت. نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که در شرایط کمبود روی میزان بیان ژن‌های *NAS1* ، *NAS2* و *NAS3* در ریشه و برگ رقم روی-کارا بیشتر از رقم روی-ناکارا گندم نان افزایش می‌یابد که این امر احتمالاً از طریق افزایش سنتز کلاته‌کننده‌های روی مانند نیکوتین آمین و موجینئیک اسید در ریشه و برگ ارقام روی-کارا، جذب و انتقال روی را تسهیل خواهد بخشید.

واژه‌های کلیدی: بیان نسبی، کمبود روی، گندم نان، نیکوتین‌آمین سینتتاز، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی

مقدمه

گندم نان با نام علمی *Triticum aestivum* L. مهمترین محصول زراعی جهان است که بالغ بر ۲۰ درصد کالری مردم جهان را تامین می‌کند (۶). گندم در بیش از ۲۴۰ میلیون هکتار از اراضی جهان کشت می‌شود. در ایران سطح زیرکشت این محصول ۵/۸۵ میلیون هکتار است. گندم در ایران منبع اصلی کربوهیدرات به‌شمار می‌رود و در موارد مختلفی مانند تغذیه انسان و دام کاربرد دارد (۷). تولید گندم در سراسر دنیا با تنش‌های محیطی مواجه است که از جمله آنها تنش‌های غیرزیستی مانند کمبود عناصر کم‌مصرف در خاک می‌باشد. عناصر کم‌مصرف، عناصری هستند که به‌میزان اندک مورد نیاز موجود زنده می‌باشند ولی با وجود همین مقدار کم، نقش حیاتی در بسیاری از فرایندهای گیاه ایفا می‌کنند (۲۹). کمبود برخی از این عناصر نظیر آهن و روی در گیاهان زراعی گسترش جهانی دارند (۸). کمبود روی در خاک، علاوه بر کاهش عملکرد و درصد پروتئین دانه، موجب افت ارزش تغذیه‌ای محصول گندم شده و استفاده از نان حاصل سبب بروز کمبود این عنصر در انسان می‌شود (۲۳).

طی سالیان گذشته، مطالعه بر روی افزایش میزان روی در گیاهان کمتر در برنامه‌های اصلاحی مورد توجه قرار گرفته است، در صورتی‌که افزایش کارایی میزان جذب و افزایش مقدار این عنصر در بذر گیاهان زراعی از طریق اصلاح نباتات امکان‌پذیر است (۱۴). کمبود روی یکی از شایع‌ترین تنش‌های غیر زیستی مواد غذایی در گیاهان در سراسر جهان است که در بیشتر اقلیم‌ها دیده می‌شود. طی تحقیقاتی که در ۲۵ کشور جهان به‌عمل آمده، مشاهده شده است که بیش از ۲۵ درصد خاک‌های این کشورها کمبود بسیار شدیدی از لحاظ روی دارند (۱۸،۸). روی که یکی از عناصر کم‌مصرف است برای ساختار و عملکرد طیف گسترده‌ای از ماکرومولکول‌ها، مانند آنزیم‌ها مورد نیاز است. در جانوران عالی و انسان برآورد شده است که حدود ۳ هزار پروتئین واجد گروه پروستتیک[۱] روی هستند (۱). در گیاهان، کمبود روی باعث کاهش زیست توده، سوختگی حاشیه‌ای، بدشکلی و رنگ‌پریدگی برگ‌ها و کاهش عملکرد می‌شود (۵). گونه‌های مختلف غلات حساسیت متفاوتی نسبت به کمبود روی از خود نشان می‌دهند. ژنوتیپ‌های روی-کارا توانایی زیادی در جذب و انتقال روی در خاک‌های فقیر از لحاظ روی را دارند و عملکرد بالاتری نسبت به ژنوتیپ‌های روی-ناکارا در این شرایط نشان می‌دهند (۹). ژن‌های متعددی مانند Cation diffusion facilitator (*CDF*)، Nicotianamine synthase (*NAS*) و ZRT, IRT like-proteins (*ZIP*) در جذب روی از خاک و انتقال آن در داخل گیاه دخالت دارند (۲۷،۵).

در گیاهان خانواده گرامینه جذب روی از طریق ریشه به‌طور عمده بوسیله یکسری مواد کلاته‌کننده از خانواده فیتوسیدروفرها[۱] صورت می‌گیرد. این مواد با ایجاد پیوند با روی موجود در محیط ریزوسفر، آن را به‌صورت محلول در آورده و مقدمات جذب روی از طریق ریشه را فراهم می‌کنند (۲). از مهم‌ترین فیتوسیدروفورها می‌توان موجینئیک‌اسید[۲] (MA) را نام برد که با تشکیل کمپلکس MA-Zn باعث جذب روی از خاک می‌شود (۱۵). از جمله کلاته‌کننده‌های دیگر، نیکوتین‌آمین[۳] (NA) یک آمینواسید غیرپروتئینی است

1- Phytosiderophore 2- Mugineic acid 3- Nicotianamine

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-12]
[DOI: 10.52547/jcb.12.36.171]

که تمایل شدیدی برای اتصال با فلزات روی، آهن، مس، نیکل و منگنز دارد (۲۸). نیکوتین‌آمین در همه گیاهان عالی حضور دارد و توسط آنزیم نیکوتین‌آمین ترنسفراز (NAS) بوسیله تریمریزاسیونS-adenosyl methionine کاتالیز می‌شود (۴). نیکوتین‌آمین علاوه بر اینکه یک ماده حدواسط در فرآیند تولید کلاته‌کننده‌های مهم روی مثل موجینئیک اسید است، به‌دلیل میل فراوان به ترکیب با فلزات سنگینی مثل روی، می‌تواند به‌عنوان یک انتقال دهنده به‌صورت کمپلکس Zn-NA عمل نموده و در جذب این عناصر از خاک و همچنین انتقال آن درون گیاه نقش داشته باشد (۲۸).

گیاهان برای جذب فلزات از طریق ریشه، از دو راهکار استفاده می‌کنند. راهکار نوع اول که در گیاهان غیرگرامینه دیده می‌شود، گیاه از طریق یکسری کانال‌ها پروتون‌هایی را به محیط خاک منتشر می‌کند که باعث کاهش اسیدیته خاک شده و حلالیت هرچه بیشتر فلزات و در نهایت شرایط را برای احیای فلز و جذب آن فراهم می‌آورد. راهکار نوع دوم که بر پایه کلاته کردن فلزات استوار است به‌وسیله یکسری مواد کلاته‌کننده که از طریق کانال‌های خاص به محیط ریزوسفر انتشار می‌یابد، انجام می‌شود (۱۹،۱۰). این مواد که عمدتاً از خانواده موجینئیک اسیدها (MA) می‌باشند با ایجاد کمپلکس فلز–موجینئیک اسید باعث جذب عناصر فلزی از خاک می‌شوند (۳۰). نیکوتین‌آمین علاوه بر اینکه یک ماده حدواسط در فرآیند تولید کلاته‌کننده‌های مهم روی مثل موجینئیک اسیدها می‌باشد، به‌دلیل میل فراوان به ترکیب با فلزات سنگینی مثل روی، می‌تواند به‌عنوان یک انتقال‌دهنده و کلاته‌کننده به‌صورت کمپلکس Zn-NA عمل نموده و در جذب و انتقال این عناصر درون گیاه نقش داشته باشد. ژن‌های *NAS* در مرحله انتهایی سنتز نیکوتین‌آمین نقش دارند (۱۱).

ژن‌های *NAS* که در سنتز نیکوتین آمین دخالت دارند در گیاه ذرت بر اساس میزان بیان به دو گروه تقسیم‌بندی می‌شوند: گروه اول تحت شرایط کمبود آهن و روی القا می‌شوند در حالی‌که گروه دوم در صورتی بیان می‌شوند که روی در دسترس باشد (۳۱،۲۷). مطالعه بیان ژن‌های *NAS* در گیاه *T. monococcum* نشان داد که ژن‌های *TmNAS2*, *TmNAS3* و *TmNAS1* در شرایط کمبود روی بیان می‌شوند (۱۲). در آزمایشی انتقال ژن *OsNAS2* از گیاه برنج به گندم باعث افزایش معنی‌دار میزان روی در دانه گندم شد (۲۴). همچنین ژن *HvNAS1* که در شرایط کمبود روی در جو بیان شد، باعث تولید دو برابری آنزیم دئوکسی موجینئیک سینتاز نسبت به تیمار شاهد شد، که در مسیر بیوسنتز نیکوتین آمین نقش کلیدی دارد (۲۶). در انتقال ژن *NAS2* جو به برنج، گزارش شد که غلظت روی بصورت معنی‌داری در بذر برنج افزایش یافت. همچنین مشاهده شد که همبستگی مثبتی بین بیان ژن *NAS2* در شاخساره و غلظت روی در دانه برنج وجود دارد. علاوه بر این وجود یک همبستگی مثبت بین غلظت نیکوتین‌آمین و دئوکسی‌موجینئیک اسید با میزان روی دانه، نشان می‌دهد که تولید نیکوتین‌آمین باعث انتقال روی به دانه می‌شود (۱۷). ایشیمورا و همکارن (۱۶) گزارش کردند که ژن *NASHOR2* (از خانواده *NAS*) در شرایط کمبود روی در ساقه جو بیان می‌شود. همچنین پیشنهاد کردند که کمبود روی باعث القا سنتز دئوکسی‌موجینئیک اسید در شاخساره جو می‌شود. لازم به ذکر است که دئوکسی‌موجینئیک اسید طی یک فرآیند آنزیمی از نیکوتین‌آمین ساخته می‌شود که این ماده نیز محصول مستقیم ژن‌های *NAS* می‌باشد. بنابراین با توجه به اهمیت ژن‌های *NAS* در سنتز نیکوتین آمین و موجینئیک اسیدها به‌عنوان کلاته‌کننده‌های مهم دخیل در جذب و انتقال روی در گیاهان، در این تحقیق بیان ژن‌های *NAS1*،*NAS2* و*NAS3* در شرایط کمبود روی در ریشه و برگ ارقام روی–کارا و روی–ناکارا گندم نان در دو مرحله رشدی طویل شدن ساقه (مرحله رویشی) و ۳۰ درصد گلدهی (مرحله زایشی) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

کشت مواد گیاهی

آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در سال ۱۳۹۷ در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه ارومیه اجرا شد. بذور ارقام هامون (روی–کارا) و هیرمند (روی–ناکارا) (۳) در شرایط تنش کمبود روی خاک و کفایت آن (به‌ترتیب صفر و ۵ میلی‌گرم روی در کیلوگرم خاک) (۱۳)کشت و از ریشه و برگ (برگ میانی در مرحله رویشی و برگ پرچم در مرحله زایشی) گیاهان در دو مرحله‌ی طویل شدن ساقه (رویشی) و ۳۰ درصد گلدهی (زایشی) نمونه‌برداری انجام گرفت و با استفاده از نیتروژن مایع به فریزر با دمای ۸۰– درجه سانتی‌گراد منتقل شد. خاک مورد استفاده در این پژوهش از بستر شنی منطقه شبستر تبریز، با مقدار بسیار کم روی تهیه شد. خاک استفاده شده (جدول ۱)، بعد از غربال با الک ۲ میلی‌متری، ابتدا ۵ بار با آب معمولی شسته شد و سپس با آب دوبار تقطیر آب‌کشی انجام گرفت. در نهایت به‌منظور اطمینان از کمبود روی خاک, مجددا آزمون تجزیه خاک انجام گرفت.مواد غذایی مورد نیاز (۲۰) قبل از کشت بصورت محلول تهیه شده و با خاک گلدان‌ها مخلوط شد. جهت جلوگیری از کمبود نیتروژن، محلول نیترات آمونیوم هر دو هفته یکبار به گلدان‌ها افزوده شد. علاوه بر مواد غذایی، به نیمی از گلدان‌ها عنصر روی به‌صورت ZnSO4.7H2O، به همراه آب آبیاری داده شد. بذور ارقام مورد کشت توسط آب اکسیژنه یک درصد ضدعفونی و سپس در گلدان‌های پلی‌اتیلنی حاوی ۴ کیلوگرم خاک کشت شد. در طول فصل، آبیاری با استفاده از آب دو بار تقطیر در حد ظرفیت زراعی انجام شد.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.52547/jcb.12.36.171]

جدول ۱- مشخصات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده در این آزمایش
Table 1. Physical and chemical characteristics of the sandy soil used in the experiment

شن Sand (%)	سیلت Silt (%)	رس Clay (%)	روی Zn (ppm)	پتاسیم Potassium (ppm)	فسفر Phosphorus (ppm)	نیتروژن Nitrogen (%)	مواد آلی Organic matter (%)	آهک Lime (%)	اسیدیته Acidity (%)	شوری Salinity (mmoh/Cm)
۹۶	۱	۳	۰/۱۵	۹/۴	۲/۵	۰/۶۱	۰/۶۹	۹	۷/۸	۱/۱۹

استخراج RNA و سنتز cDNA

به‌منظور استخراج RNA از ریشه و برگ نمونه‌های گیاهی (۰/۲ میلی گرم)، از محلول استخراج RNX-plus (سیناکلون، ایران) استفاده شد. برای تعیین کیفیت و کمیت RNA استخراج شده از دستگاه نانودراپ و ژل آگارز یک درصد استفاده شد.

سپس به‌منظور حذف آلودگی DNA ژنومی باقیمانده در نمونه‌های RNA استخراجی، تیمار DNase بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده کیت سنتز cDNA انجام گرفت. سنتز cDNA با استفاده از کیت RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific، امریکا) طبق دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت. به‌منظور اطمینان از عدم وجود آلودگی DNA در RNA استخراجی و اجزای واکنش، واکنش‌های کنترل RT- (عدم استفاده از آنزیم Reverse transcriptase) و NTC (عدم استفاده از RNA) در حین سنتز cDNA طبق دستورالعمل کیت سنتز در نظر گرفته شد.

طراحی آغازگر و واکنش‌های Real time PCR

به‌منظور مطالعه بیان ژن‌های *NAS1*، *NAS2* و *NAS3* در شرایط کمبود روی نسبت به تیمار شاهد، توالی این ژن‌ها از سایت NCBI استخراج و آغازگرها (جدول ۳) با استفاده از نرم‌افزارهای FastPCR و Gene Runner طراحی شد.

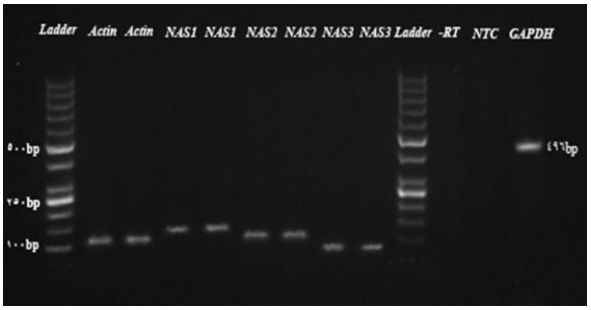
جدول ۲- خصوصیات آغازگرهای مورد استفاده در واکنش‌های Real Time PCR
Table 2. Characteristics of the primers used in real time PCR reactions

ژن Gene	شماره دسترسی Accession number	توالی آغازگر Primer sequence (5' – 3')	دمای اتصال Annealing temperature (C°)	طول محصول (جفت باز) Amplicon length (bp)
Actin3	TC234027	F: gacgcacaacaggtatcgtgttg R: cagcgaggtcaagacgaaggatg	۶۰	۱۰۷
NAS1	KU529948	F: gcactactccgacatgctcaccg R: ggagccgccatgtgaccg	۶۰	۱۲۹
NAS2	KU529964	F: ggtcggtgaagagcctgtcg R: aaggaggtcgctgctctgat	۶۴	۱۰۶
NAS3	KU529947	F: gacgtggtgaactccgttatcg R: catgcccacggtgatgtcc	۶۰	۷۰

واکنش‌های Real time PCR در حجم ۱۲/۵ میکرولیتر در سه تکرار زیستی طبق دستورالعمل کیت SYBR Green/ROX qPCR Maser Mix (Thermo Scientific، آمریکا) در دستگاه Rotor-Gene Q مدل ۶۰۰۰ (کیاژن، آمریکا) انجام گرفت. از ژن اکتین۳ به‌عنوان ژن مرجع در واکنش‌های Real time PCR استفاده شد (۲۱). الگوی دمایی واکنش‌ها بر اساس اندازه‌ی محصول و دمای اتصال آغازگرها به‌صورت: فعال‌سازی ابتدایی آنزیم در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه (یک چرخه) و سپس ۴۰ چرخه شامل ۹۵ درجه به‌مدت ۱۵ ثانیه جهت واسرشته‌سازی cDNA، اتصال آغازگرها در دمای ویژه هر ژن (جدول ۳) به‌مدت ۳۰ ثانیه و مرحله بسط در دمای ۷۲ درجه به‌مدت ۴۰ ثانیه انجام گرفت. بعد از اتمام واکنش، منحنی ذوب هرکدام از ژن‌ها رسم و صحت تکثیر محصول مربوط به هر ژن با استفاده از منحنی ذوب همان ژن و الکتروفورز ژل آگارز یک‌درصد (شکل ۱) تایید شد. همچنین بعد از محاسبه چرخه آستانه (Cycle of threshold: Ct) با نرم‌افزار Rotor-GeneQ، مقدار بیان نسبی ژن‌های مورد نظر در گیاهان تیمار شده (شرایط کمبود روی) نسبت به کنترل (شرایط کفایت روی) با استفاده از روش $\Delta\Delta CT$ محاسبه گردید (۲۲). به‌منظور بررسی نرمال بودن داده‌ها و اشتباهات آزمایشی از روش کلموگراف–اسمیرنوف در نرم‌افزار MINITAB (نسخه ۱۹) و برای انجام تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها به‌روش SNK در سطح احتمال ۱۰/۰۱از نرم‌افزار SAS (نسخه ۹/۱) استفاده شد.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.52547/jcb.12.36.171]



شکل ۱- باندهای حاصل از تکثیر cDNA با آغازگرهای ژن‌های *NAS1*، *NAS2* و *NAS3* و ژن *Actin* به‌همراه واکنش‌های کنترل منفی RT- (تکثیر cDNA بدون آنزیم Reverse transcriptase)، NTC (تکثیر cDNA بدون RNA استخراجی) و کنترل مثبت (ژن GAPDH)

Figure 1. Amplified fragments of cDNAs using NAS1, NAS2, NAS3 and Actin3 primers along with negative control reactions of -RT (cDNA amplification without reverse transcriptase) and NTC (cDNA amplification without extracted RNA) and positive control reaction (GAPDH gene).

نتایج و بحث

تجزیه واریانس داده‌های حاصل از بیان نسبی ژن‌های *NAS1*، *NAS2* و *NAS3* نشان داد که اثرات متقابل سه جانبه رقم × بافت × مرحله نمونه‌برداری بر بیان هر سه ژن در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۴).

جدول ۳- تجزیه واریانس بیان نسبی ژن‌های *NAS1*، *NAS2* و *NAS3* تحت تنش کمبود روی (Zn) در ریشه و برگ ارقام روی-کارا (هامون) و روی-ناکارا (هیرمند) گندم نان در مراحل رویشی و زایشی

Table 3. Analysis of variance for relative expression of *NAS1*, NAS2 and *NAS3* genes in root and leaf of Zn-efficient (Hamoun) and –inefficient (Hirmand) bread wheat cultivars at vegetative and reproductive stages

منابع تغییرات	درجه آزادی	*NAS1*	*NAS2*	*NAS3*
رقم	۱	۷۰/۹۱**	۷/۰۵**	۷/۱**
بافت	۱	۲۳/۳۶**	۲۲/۶**	۰/۲۹*
مرحله نمونه‌برداری	۱	۲۵/۷۸**	۵/۱۶**	۶۳/۹۵**
رقم × بافت	۱	۱/۸۲**	۹/۱۵**	۱/۱۹**
رقم × مرحله نمونه‌برداری	۱	۲/۲۸**	۳/۸۳**	۴/۳۶**
بافت × مرحله نمونه‌برداری	۱	۴/۷۷**	۰/۱^{ns}	۱/۴۱**
رقم × بافت × مرحله نمونه‌برداری	۱	۲۴/۳۲**	۳/۱۲**	۴/۵۵**
خطا	۱۶	۰/۱۳۸	۰/۰۷۷	۰/۳۷۳
CV (%)		۱۱/۲۱	۱۳/۴۸	۸/۱۰

ns, *, **: non-significant and significant at 5 and 1% probability level, respectively. Cul: cultivar, Tis: tissue, Stg: sampling stage

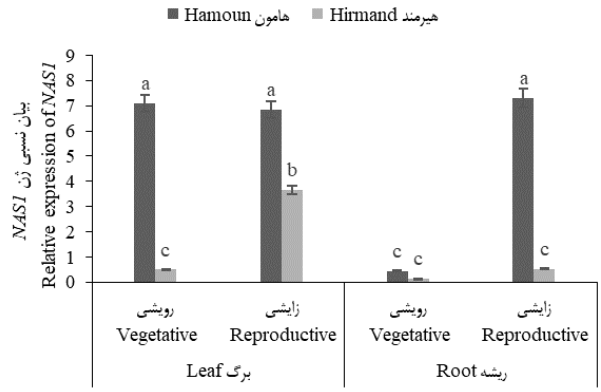
بیان نسبی ژن *NAS1*

مقایسه میانگین اثرات متقابل سه جانبه رقم × بافت × مرحله نمونه‌برداری نشان داد که بیشترین میزان افزایش بیان نسبی ژن *NAS1* (۷ برابر کنترل) در شرایط کمبود روی در ریشه رقم روی-کارای هامون در مرحله زایشی و همچنین در برگ این رقم در هر دو مرحله رویشی و زایشی مشاهده شد. البته در برگ رقم روی-ناکارا در مرحله زایشی نیز بیان نسبی این ژن بیش از ۳ برابر کنترل در شرایط کمبود روی افزایش یافت. در ریشه در مرحله رویشی بین دو رقم روی-کارا و روی-ناکارا به‌لحاظ افزایش میزان بیان نسبی این ژن اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۲). عدم وجود اختلاف معنی‌دار در بیان این ژن در ریشه در مرحله رویشی بین دو رقم نشان می‌دهد که احتمالاً ژن‌های *NAS* دیگری در رقم روی-کارا در جذب روی در ریشه در مرحله رویشی دخالت دارند (۵). افزایش معنی‌دار بیان این ژن در شرایط کمبود روی در ریشه رقم روی-کارا در مرحله زایشی و برگ همین رقم در هر دو مرحله رویشی و زایشی نسبت به رقم روی-ناکارا نشان می‌دهد که در شرایط کمبود روی در رقم روی-کارا افزایش بیان این ژن احتمالاً از طریق افزایش سنتز نیکوتین آمین (کلاته‌کننده روی) و در نتیجه افزایش مقدار موجینئیک اسید در ریشه و برگ باعث افزایش جذب روی می‌شود (۲۶) همچنین افزایش بیان این ژن در برگ رقم روی-کارا احتمالاً موجب افزایش سنتز این دو ترکیب در برگ و در نتیجه انتقال روی از برگ به دانه و سایر اندام‌ها از طریق تشکیل کمپلکس روی- موجینئیک اسید و روی- نیکوتین آمین می‌شود. در برنج بیان بیش از حد ژن *NAS1* علاوه بر این که باعث افزایش غلظت روی در بذر می‌شود سبب افزایش دسترسی زیستی ریشه گیاه به روی نیز می‌شود (۴). در جو نیز گزارش شده است که بیان ژن *NAS1* در شرایط کمبود روی افزایش یافت. علاوه بر این در شرایط کمبود روی در گیاه جو مقدار بیشتری از ترکیب روی-دئوکسی موجینئیک اسید در شاخساره نسبت به ریشه مشاهده‌شد که نشان می‌دهد کمبود روی باعث افزایش سنتز دئوکسی‌موجینئیک اسید در ساقه می‌شود. همچنین کمبود روی باعث افزایش مقدار دئوکسی

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.52547/jcb.12.36.171]

موجینئیک اسید در ریشه جو می‌شود. بنابراین حضور دئوکسی‌موجینئیک اسید در ریشه باعث کلاته‌کردن روی و افزایش جذب آن از خاک می‌شود. همچنین افزایش دئوکسی‌موجینئیک اسید در شاخساره‌ها با تشکیل کمپلکس روی–دئوکسی موجینئیک اسید احتمالاً باعث انتقال روی در داخل گیاه می‌شود (۲۶).



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل رقم × بافت × مرحله نمونه‌برداری بر بیان ژن *NAS1* در ریشه و برگ ارقام روی–کارا (هامون) و روی–ناکارا (هیرمند) گندم نان در دو مرحله رویشی و زایشی (ستون‌هایی که دارای حروف مشترک می‌باشند بر اساس آزمون چند دامنه‌ای SNK اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد ندارند).

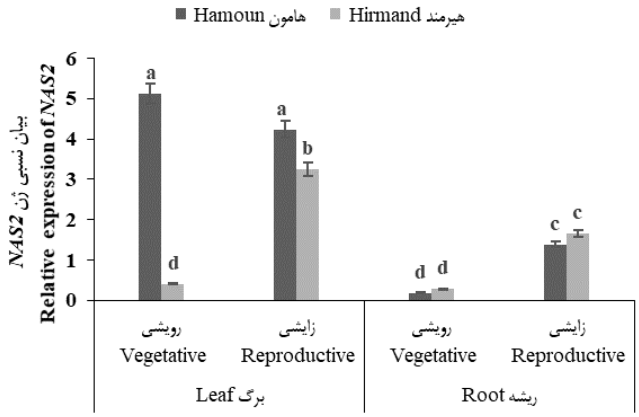
Figure 2. Mean comparison for cultivar × tissue × sampling stage interaction on the relative expression of *NAS1* gene in Zn-efficient (Hamoun) and –inefficient (Hirmand) bread wheat cultivars (Columns with the common letters show no significant difference based on SNK test at %1 probability level).

بیان نسبی ژن *NAS2*

بر اساس نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل سه‌جانبه رقم × بافت × مرحله نمونه‌برداری، بیشترین میزان افزایش بیان نسبی ژن *NAS2* در شرایط کمبود روی در برگ رقم روی–کارا هامون در مراحل رویشی و زایشی مشاهده شد. در برگ رقم روی–ناکارا نیز در مرحله زایشی افزایش بیان این ژن مشاهده شد که به‌طور معنی‌داری کمتر از رقم روی–کارا بود. البته در مرحله زایشی در ریشه هر دو رقم افزایش جزئی در بیان این ژن مشاهده شد ولی در مرحله رویشی بیان این ژن کاهش یافت. همچنین در هر دو مرحله رویشی و زایشی بین میزان بیان این ژن در ریشه دو رقم اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. (شکل۳). افزایش معنی‌دار بیان این ژن در شرایط کمبود روی در برگ رقم روی–کارا در هر دو مرحله رویشی و زایشی نسبت به رقم روی–ناکارا نشان می‌دهد که احتمالاً در شرایط کمبود روی در رقم روی–کارا افزایش بیان این ژن در برگ باعث افزایش سنتز نیکوتین آمین (کلاته‌کننده روی) و در نتیجه افزایش مقدار موجینئیک اسید در برگ می‌شود. افزایش این دو ترکیب در برگ احتمالا با تشکیل کمپلکس روی– موجینئیک اسید و روی–نیکوتین آمین باعث تسهیل انتقال روی از برگ به دانه و سایر اندام‌ها می‌شود. همچنین عدم افزایش یا افزایش جزئی بیان این ژن در ریشه در شرایط کمبود روی نشان می‌دهد که این ژن بیان اختصاصی در برگ دارد و احتمالاً در سنتز این دو ترکیب در ریشه نقشی ندارد. در انتقال ژن *NAS2* برنج به گیاه گندم نیز گزارش شد که بیان این ژن در برگ بیشتر از ریشه می‌باشد همچنین بیان این ژن در گندم موجب افزایش ۲/۵ برابری روی دانه در مقایسه با شاهد شد (۲۴). انتقال ژن *NAS2* جو به برنج نیز باعث افزایش معنی‌دار غلظت روی در بذر شد همچنین همبستگی مثبتی بین بیان ژن *NAS2* در شاخساره و غلظت روی در دانه مشاهده شد. علاوه بر این وجود یک همبستگی مثبت بین غلظت نیکوتین‌آمین و دئوکسی‌موجینئیک اسید با میزان روی دانه در برنج نشان می‌دهد که احتمالا القای بیان این ژن از طریق افزایش تولید نیکوتین‌آمین باعث انتقال روی به دانه می‌شود (۱۷). ایشیمورا و همکارن (۱۶) گزارش کردند که ژن *NAS2* در شرایط کمبود روی در ساقه جو بیان می‌شود. همچنین پیشنهاد کردند که کمبود روی باعث القا سنتز دئوکسی‌موجینئیک اسید در شاخساره جو می‌شود. لازم به ذکر است که دئوکسی‌موجنیک اسید طی یک فرآیند آنزیمی از نیکوتین‌آمین ساخته می‌شود که این ماده نیز محصول مستقیم ژن‌های *NAS* می‌باشد.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.52547/jcb.12.36.171]

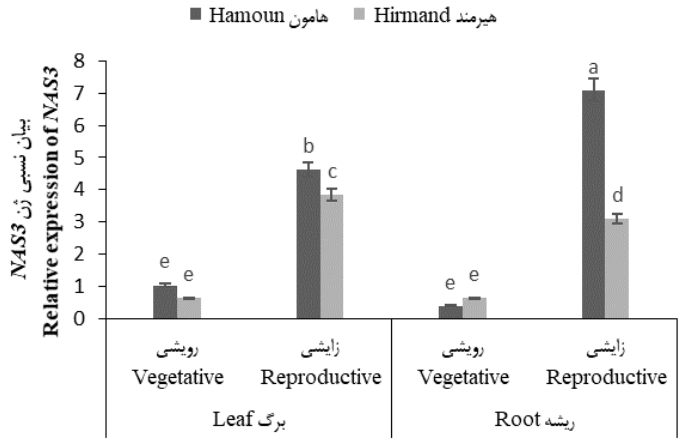


شکل ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل رقم × بافت × مرحله نمونه‌برداری بر بیان ژن *NAS2* در ریشه و برگ ارقام روی–کارا (هامون) و روی–ناکارا (هیرمند) گندم نان در دو مرحله رویشی و زایشی (ستون‌هایی که دارای حروف مشترک می‌باشند بر اساس آزمون چند دامنه‌ای SNK اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد ندارند).

Figure 3. Mean comparison for cultivar × tissue × sampling stage interaction on the relative expression of *NAS2* gene in Zn-efficient (Hamoun) and –inefficient (Hirmand) bread wheat cultivars (Columns with the common letters show no significant difference based on SNK test at %1 probability level).

بیان نسبی ژن *NAS3*

نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل رقم × بافت × مرحله نمونه‌برداری بر بیان ژن *NAS3* نشان داد که در شرایط کمبود روی، بیان این ژن در هر دو اندام ریشه و برگ در مرحله زایشی در هر دو رقم افزایش یافت البته این افزایش در رقم روی–کارا بطور معنی‌داری بیشتر از رقم روی–ناکارا بود به‌طوریکه بیشترین میزان افزایش (بیش از ۷ برابر کنترل) در ریشه رقم روی–کارا هامون مشاهده شد. در مرحله رویشی در هر دو اندام، افزایشی در بیان این ژن مشاهده نشد (شکل ۴). افزایش بیان نسبی این ژن در مرحله زایشی در ریشه و برگ در شرایط کمبود روی نشان می‌دهد که بیان این ژن اختصاصی اندام نبوده ولی وابسته به مرحله رشدی می‌باشد. القای بیان این ژن در شرایط کمبود روی در ریشه و برگ در مرحله زایشی احتمالاً از طریق افزایش سنتز نیکوتین آمین و موجنئیک اسید موجب تسهیل جذب روی از خاک و انتقال آن در داخل گیاه و به دانه می‌شود. سوزوکی و همکاران (۲۵) نشان دادند که افزایش میزان دئوکسی موجینئیک اسید در شاخساره برنج همبستگی مثبتی با افزایش بیان ژن *NAS3* در برنج دارد. همچنین گزارش کردند که در گیاه برنج انتقال روی در داخل گیاه از طریق کمپلکس دئوکسی موجینئیک اسید–روی صورت می‌گیرد در حالیکه جذب روی از طریق ریشه به‌واسطه کمپلکس موجنئیک اسید– روی صورت می‌گیرد. در هر صورت ژن‌های *NAS* در مسیر تولید موجینئیک اسیدها باعث تولید نیکوتین آمین می‌شوند که این ماده نیز به دئوکسی موجنئیک اسید و موجنئیک اسید تبدیل می‌شود که از کلاته‌کننده‌های مهم روی محسوب می‌شوند (۲۵).



شکل ۴- مقایسه میانگین اثر متقابل رقم × بافت × مرحله نمونه‌برداری بر بیان ژن *NAS3* در ریشه و برگ ارقام روی–کارا (هامون) و روی–ناکارا (هیرمند) گندم نان در دو مرحله رویشی و زایشی (ستون‌هایی که دارای حروف مشترک می‌باشند بر اساس آزمون چند دامنه‌ای SNK اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد ندارند).

Figure 4. Mean comparison for cultivar × tissue × sampling stage interaction on the relative expression of *NAS3* gene in Zn-efficient (Hamoun) and –inefficient (Hirmand) bread wheat cultivars (Columns with the common letters show no significant difference based on SNK test at %1 probability level).

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.52547/jcb.12.36.171]

به‌طور کلی نتایج تحقیق حاضر نشان‌داد که تنش کمبود روی میزان بیان نسبی ژن‌های *NAS1*، *NAS2* و *NAS3* را در رقم روی-کارا گندم نان به‌طور معنی‌داری بیشتر از رقم روی- ناکارا افزایش می‌دهد ولی این افزایش وابسته به اندام و مرحله رشدی می‌باشد. افزایش معنی‌دار بیان ژن‌های *NAS1* و *NAS3* در شرایط کمبود روی در ریشه و برگ رقم روی-کارا نسبت به رقم روی-ناکارا نشان می‌دهد که در شرایط کمبود روی افزایش بیان این ژن‌ها در رقم روی-کارا احتمالا باعث افزایش سنتز نیکوتین آمین (کلاته‌کننده روی) و در نتیجه افزایش مقدار موجینئیک اسید در ریشه و برگ می‌شود. حضور نیکوتین آمین و موجینئیک اسید در ریشه و برگ باعث کلاته کردن روی و افزایش جذب آن از خاک و تسهیل انتقال آن از برگ به دانه و سایر اندام‌ها می‌شود. همچنین افزایش معنی‌دار بیان ژن *NAS2* در شرایط کمبود روی در برگ رقم روی-کارا در هر دو مرحله رویشی و زایشی نسبت به رقم روی-ناکارا نشان می‌دهد که القای بیان این ژن در شرایط کمبود روی در برگ رقم روی- کارا احتمالاً از طریق افزایش سنتز کلاته‌کننده‌های روی باعث انتقال راحت روی از برگ به دانه و سایر اندام‌ها می‌شود. همچنین عدم افزایش یا افزایش جزئی بیان این ژن در ریشه در شرایط کمبود روی نشان می‌دهد که این ژن بیان اختصاصی در برگ دارد و احتمالاً این ژن در سنتز این دو ترکیب در ریشه نقشی ندارد. در ادامه این تحقیق پیشنهاد می‌شود میزان ترکیبات نیکوتین آمین و موجینئیک اسیدها در ریشه، برگ و حتی بذر اندازه‌گیری شود و میزان همبستگی بین بیان ژن‌های *NAS* با میزان این ترکیبات در شرایط کمبود روی مطالعه شود.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی و دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه ارومیه بخاطر فراهم کردن امکانات و هزینه انجام تحقیق قدردانی می‌شود.

منابع

1. Alloway, B.J. 2009. Soil factors associated with zinc deficiency in crops and humans. Environ Geochem Health, 31(5): 537-548.
2. Arnold, T., G.J. Kirk, M. Wissuwa, M. Frei, F.J. Zhao, T.F. Mason and D.J. Weiss. 2010. Evidence for the mechanisms of zinc uptake by rice using isotope fractionation. Plant, cell & environment, 33(3): 370-381.
3. Baghban-Tabiat, S. and M.H. Rasouli-Sadaghiani. 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).
4. Bashir, K., Y. Ishimaru and N.K. Nishizawa. 2012. Molecular mechanisms of zinc uptake and translocation in rice. Plant and Soil, 361(1): 189-201.
5. Bouain, N., Z. Shahzad, A. Rouached, G.A. Khan, P. Berthomieu, C. Abdelly and H. Rouached. 2014. Phosphate and zinc transport and signalling in plants: toward a better understanding of their homeostasis interaction. Journal of Experimental Botany, 65(20): 5725-5741.
6. Brenchley, R., M. Spannagl, M. Pfeifer, G.L.A. Barker, R. D'Amore, A.M. Allen, N. McKenzie, M. Kramer, A. Kerhornou, D. Bolser, S. Kay, D. Waite, M. Trick, I. Bancroft, Y. Gu, N. Huo, M.C. Luo, S. Sehgal, B. Gill, S. Kianian, O. Anderson, P. Kersey, J. Dvorak, W.R. McCombie, A. Hall, K.F.X. Mayer, K.J. Edwards, M.W. Bevan and N. Hall. 2012. Analysis of the bread wheat genome using whole-genome shotgun sequencing. Nature, 491(7426): 705-710.
7. Bushuk, W. and V.F. Rasper. 1994. Wheat: Production, Properties and Quality (V. F. R. W. Bushuk Ed.): Springer Science& Business Media.
8. Cakmak, I. 2000. Tansley Review No. 111 Possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species. New Phytologist, 146(2): 185-205.
9. Cakmak, I., A. Yilmaz, M. Kalayci, H. Ekiz, B. Torun and H.J. Braun. 1996. Zinc deficiency as a critical problem in wheat production in Central Anatolia. Plant and Soil, 180(2): 165-172.
10. Callahan, D.L., A.J.M. Baker, S.D. Kolev and A.G. Wedd. 2006. Metal ion ligands in hyperaccumulating plants. JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry, 11(1): 2-12.
11. Clemens, S., U. Deinlein, H. Ahmadi, S. Höreth and S. Uraguchi. 2013. Nicotianamine is a major player in plant Zn homeostasis. BioMetals, 26(4): 623-632.
12. Du, X., H. Wang, J. He, B. Zhu, J. Guo, W. Hou and X. Zhang. 2018. Identification of nicotianamine synthase genes in Triticum monococcum and their expression under different Fe and Zn concentrations. Gene, 672: 1-7.
13. Ekhtiyari, M. and B. Abdollahi Mandoulakani. 2020. Effect of Zn deficiency stress on expression pattern of genes encoding bZIP4, bZIP79 and bZIP97 transcription factors in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. Iranian Society of Crops and Plant Breeding Sciences, 21(4): 344-353.
14. Feizi, M., M. Solouki, B. Sadeghzadeh, B. Fakheri and A. Mohammadi. 2019. QTL Mapping for Higher Seed Zn Concentration and Content in Baley using SSR Markers. Journal of Crop Breeding, 11(30): 58-67.
15. Gao, L. and J. Xiong. 2018. Improving Rice Grain Quality by Enhancing Accumulation of Iron and Zinc While Minimizing Cadmium and Lead. Developments, 45 pp.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.52547/jcb.12.36.171]

16. Ishimaru, Y., K. Bashir and N.K. Nishizawa. 2011. Zn Uptake and Translocation in Rice Plants. Rice, 4(1): 21-27.
17. Masuda, H., K. Usuda, T. Kobayashi, Y. Ishimaru, Y. Kakei, M. Takahashi and N.K. Nishizawa. 2009. Overexpression of the Barley Nicotianamine Synthase Gene HvNAS1 Increases Iron and Zinc Concentrations in Rice Grains. Rice, 2(4): 155-166.
18. Mattiello, E.M., H.A. Ruiz, J.C. Neves, M.C. Ventrella and W.L. Araújo. 2015. Zinc deficiency affects physiological and anatomical characteristics in maize leaves. Journal of Plant Physiology, 183: 138-143.
19. Morrissey, J. and M.L. Guerinot. 2009. Iron Uptake and Transport in Plants: The Good, the Bad, and the Ionome. Chemical Reviews, 109(10): 4553-4567.
20. Niazkhani, S. M., B. Abdollahi Mandoulakani, M. Jafari and M. Rasouli-Sadaghiani. 1970. Studying the expression of ZIP1, ZIP3 and ZIP6 genes in bread wheat under Zn deficiency conditions. Cereal Research, 8(3): 345-358.
21. Paolacci, A. R., O. A. Tanzarella, E. Porceddu and M. Ciaffi. 2009. Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. BMC Molecular Biology, 10(1): 11.
22. Rao, X., X. Huang, Z. Zhou and X. Lin. 2013. An improvement of the 2ˆ(-delta delta CT) method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. Biostatistics, Bioinformatics and Biomathematics, 3(3): 71-85.
23. Shoormij, F., S.S. Alavi Kia, M. Moghaddam Vahed and M. Toorchi. 2017. Genetic Variability of Zinc Efficiency in Some Iranian Spring Wheat Varieties. Journal of Crop Breeding, 8(19): 24-17.
24. Singh, S.P., B. Keller, W. Gruissem and N. K. Bhullar. 2017. Rice NICOTIANAMINE SYNTHASE 2 expression improves dietary iron and zinc levels in wheat. Theoretical and Applied Genetics, 130(2): 283-292.
25. Suzuki, M., K.C. Morikawa, H. Nakanishi, M. Takahashi, M. Saigusa, S. Mori and N.K. Nishizawa. 2008. Transgenic rice lines that include barley genes have increased tolerance to low iron availability in a calcareous paddy soil. Soil Science and Plant Nutrition, 54(1): 77-85.
26. Suzuki, M., M. Takahashi, T. Tsukamoto, S. Watanabe, S. Matsuhashi, J. Yazaki and N.K. Nishizawa. 2006. Biosynthesis and secretion of mugineic acid family phytosiderophores in zinc-deficient barley. Plant Journal, 48(1): 85-97.
27. Suzuki, M., T. Tsukamoto, H. Inoue, S. Watanabe, S. Matsuhashi, M. Takahashi and N.K. Nishizawa, N. K. 2008. Deoxymugineic acid increases Zn translocation in Zn-deficient rice plants. Plant Molecular Biology, 66(6): 609-617.
28. Trampczynska, A., H. Küpper, W. Meyer-Klaucke, H. Schmidt and S. Clemens. 2010. Nicotianamine forms complexes with Zn (II) in vivo. Metallomics, 2(1): 57-66.
29. Tucker, K.L. 2016. Nutrient intake, nutritional status, and cognitive function with aging. Annals of the New York Academy of Sciences, 1367(1): 38-49.
30. Xie, X., W. Hu, X. Fan, H. Chen and M. Tang. 2019. Interactions Between Phosphorus, Zinc, and Iron Homeostasis in Nonmycorrhizal and Mycorrhizal Plants. Frontiers in Plant Science, 10: 1172-1172.
31. Zhou, X., S. Li, Q. Zhao, X. Liu, S. Zhang, C. Sun and R. Chen. 2013. Genome-wide identification, classification and expression profiling of nicotianamine synthase (NAS) gene family in maize. BMC Genomics, 14: 238.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.52547/jcb.12.36.171]

Expression Pattern of *NAS1*, *NAS2* and *NAS3* Genes under Zn Deficiency Conditions in Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.)

Esmaeil Wehbi[1] and Babak Abdollahi Mandoulakani[2]

1- M.Sc. Student of Agricultural Biotechnology, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Urmia University
2- Associate Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Urmia University (Corresponding author: b.abdollahi@urmia.ac.ir)
Received: August 16, 2020 Accepted: December 8, 2020

Abstract

A greenhouse factorial experiment was conducted in completely randomized design (CRD) with three replications to investigate the effect of soil Zn deficiency stress on the expression of three genes involved in the synthesis of metal chelating agents (*NAS1*, *NAS2* and *NAS3*) in bread wheat. Hamoun and Hirmand (Zn-efficient and inefficient cultivars, respectively) cultivars were planted under Zn deficiency (0 mg Zn / kg soil) and adequacy (5 mg Zn / kg soil) conditions and relative expression of the genes was measured in root and leaf of the cultivars at two growth stages: stem elongation (vegetative stage) and 30% of flowering (reproductive stage) using Real time PCR technique. The results revealed the highest expression of *NAS1* (7-fold) and *NAS2* (5-fold) in Zn deficiency conditions in the root of Zn-efficient cultivar (Hamoun) at reproductive stage and in the leaf of the same cultivar at vegetative stage, respectively. The highest expression of *NAS3* (7-fold) was observed in the root of Hamoun cultivar at reproductive stage. The expression of this gene was also enhanced in the leaf of both cultivars at reproductive stage under Zn deficiency conditions. In conclusion, the results of the present study demonstrated that the expression of *NAS1*, *NAS2* and *NAS3* genes in Zn-efficient cultivar under Zn deficiency stress was enhanced more than Zn-inefficient cultivar which probably facilitate Zn uptake and translocation in Zn-efficient cultivars through increasing the synthesis of Zn-chelating agents such as nicotianamine and mugineic acid in the root and leaf of the plants.

Keywords: Bread wheat, Nicotianamine Synthase, Real time PCR, Relative gene expression, Zn deficiency

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.52547/jcb.12.36.171]