



## Assessment of the Relative Expression of the Transcription Factors bHLH94, bZIP33 and WRKY46 in Bread Wheat Cultivars Under Iron Deficiency Conditions

Malek Hassanzadeh | Babak Abdollahi Mandoulakani\* | Zeinab Mahmoodian

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

\*Corresponding author ✉: [b.abdollahi@urmia.ac.ir](mailto:b.abdollahi@urmia.ac.ir)

### Article Info

**Article type:**  
Research Article

**Article history:**

Received: November 26, 2024;  
Received in revised form: March 15, 2025;  
Accepted: April 05, 2025;  
Available online: June 30, 2025

**Keywords:**

Relative expression,  
Transcription factors,  
Iron deficiency,  
Bread wheat,  
Real-time PCR

### ABSTRACT

This study aimed to assess the relative expression of transcription factors bHLH94, bZIP33, and WRKY46 under iron deficiency conditions in two iron-efficient (Pishtaz) and -inefficient (Falat) bread wheat cultivars at two levels of iron deficiency and sufficiency (1.4 and 10 mg Fe/kg soil, respectively). The roots and leaves of the plants were harvested at two stages of growth (one month after sowing) and reproductive (30% spike formation). The relative expression of the genes was evaluated using the Real-time PCR method. The results of the variance analysis of the data showed that the interaction effect of cultivar × tissue × sampling stage for all three genes was significant at the 1% probability level. The most significant increase in the relative expression of the *bHLH94* gene in iron deficiency conditions was noted in the roots of the Pishtaz (iron-efficient) cultivar in the vegetative phase (more than fourfold), as well as in the roots of the Pishtaz cultivar and the leaves of the Falat cultivar during the reproductive phase (over 2-fold). Additionally, the *bZIP33* gene showed a notable increase in expression in the roots of the Pishtaz cultivar during the vegetative stage (more than 27-fold). In contrast, the *WRKY46* gene demonstrated an impressive rise in expression in the roots during the vegetative phase (more than 50-fold) for the iron-efficient Pishtaz cultivar. Therefore, the results indicate that the highest relative expression of the genes *bHLH94*, *bZIP33*, and *WRKY46* occurred in the roots of the Pishtaz cultivar when subjected to iron deficiency conditions. Therefore, it seems that increased expression of these transcription factors in the roots of zinc-efficient bread wheat cultivars led to increased zinc uptake from the soil and its transfer to the grain and other organs.



**Cite this article:** Hassanzadeh, M., Abdollahi Mandoulakani, B. and Mahmoodian, Z. (2025). Assessment of the relative expression of the transcription factors bHLH94, bZIP33 and WRKY46 in bread wheat cultivars under iron deficiency conditions. *Plant Genetic Researches*, 12(1): 91-104.

**DOI:** <https://doi.org/10.22034/pgr.2025.2069008.1012>



## Introduction

Cereals are vital in addressing the nutritional needs of the world's population, with bread wheat (*Triticum aestivum* L.) being the most significant cultivated crop, extensively grown, produced, and utilized across a broad area of agricultural land. Plants are adversely impacted by various biotic and abiotic stresses. A notable abiotic stress that contributes to decreased plant yield is the deficiency of micronutrients in the soil. Among the micronutrients, iron and zinc deficiencies are the most significant limiting factors for agricultural production in Iran. Approximately 40% of soils in Iran contain less than 4.5 mg/kg of iron. Various genes are involved in the regulation of iron uptake and transport in plants, which are activated by different transcription factors. Transcription factors are a family of multifunctional proteins that may simultaneously control multiple pathways during stress in plants, and therefore, the genes encoding these proteins are important candidates for manipulating the regulatory pathways of stress response. Given the importance of bHLH94, bZIP33, and WRKY46 transcription factors in activating the transcription of genes involved in iron uptake and transport in plants under iron deficiency conditions, this study aimed to investigate the effect of soil iron deficiency on the expression of genes encoding these transcription factors in leaves and roots of iron-efficient and iron-inefficient bread wheat cultivars.

## Materials and Methods

A factorial experiment was conducted in the form of a completely randomized design with 3 replications in the greenhouse of the Faculty of Agriculture of Urmia University. Fe-efficient (Pishtaz) and -inefficient (Falat) bread wheat cultivars were planted at two iron levels: 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). Total RNA was extracted from the roots and leaves of plants using RNX-Plus™ solution according to the manufacturer's instructions. qRT-PCR reactions were performed according to the instructions of the Maxima SYBR Green/Fluorescence qPCR Master Mix (2x) kit /No Rox. The normality of the gene expression data and residuals was checked by the Kolmogorov–Smirnov test in MINITAB software. Analysis of variance (ANOVA) and SNK test for comparison of the means were implemented in SAS software version 9.2.

## Results and Discussion

The results of analysis of variance (ANOVA) for the relative expression of the selected genes in two bread wheat cultivars under iron deficiency conditions showed that the interaction effect of cultivar × tissue × sampling stage was significant for all the selected genes. The highest increase in the relative expression of *bHLH94* gene was observed in the root of the iron-efficient cultivar in the vegetative stage (more than 4-fold). Also, in the reproductive stage, the expression of this gene increased more than 2-fold in the roots of the same cultivar and the leaves of an iron-inefficient cultivar. This transcription factor may increase the expression of genes responsible for absorbing soil iron and transferring it to the aerial organs. The highest increase in the relative expression of *bZIP33* gene (more than 27-fold) was related to the root of the iron-efficient cultivar in the vegetative stage. The bZIP33 transcription factor probably plays a role in tolerance to iron deficiency stress by increasing the expression of ZIPs or through influencing other bZIPs. Based on the results, it seems that one of the reasons for the iron efficiency of bread wheat cultivars is related to the expression of the genes encoding this transcription factor in the root, leading to transferring the iron from soil to the plant cells. The enhanced expression of the gene coding for the transcription factor WRKY46 was observed under iron deficiency conditions in the root of the iron-efficient cultivar (more than 50 times) in the vegetative stage. Also, this increase was significantly higher in Pishtaz than that in Falat.

In the leaves of the Falat cultivar, the expression level of this gene in the Iron-inefficient cultivar increased significantly more than that in the efficient cultivar in the reproductive stage.

### **Conclusion**

According to the results obtained from the present study, it can be concluded that the maximum increase in the relative expression of the genes encoding bHLH94, bZIP33, and WRKY46 transcription factors was observed in the roots of Pishtaz cultivar under iron deficiency conditions. Therefore, it is likely that these transcription factors lead to an increase in the expression of genes that are responsible for absorbing soil iron and transferring it to aerial organs, as well as transporting iron from leaves to other organs.

### **Author Contributions**

M. Hassanzadeh conducted the experiment. B. Abdollahi Mandoulakani designed the experiment, supervised the research, and revised and edited the final copy of the manuscript. Z. Mahmoodian analyzed the data and write the original draft of the manuscript.

### **Data Availability Statement**

Data available on request from the authors.

### **Acknowledgements**

The authors would like to thank anonymous reviewers for their valuable suggestions in manuscript revision.

### **Ethical Considerations**

The authors avoided data fabrication, falsification, and plagiarism, and any form of misconduct.

### **Funding**

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

### **Conflict of Interest**

The authors declare no conflict of interest.

ارزیابی بیان نسبی عوامل رونویسی *bZIP33*، *bHLH94* و *WRKY46* تحت شرایط کمبود آهن در گندم نان

مالک حسن زاده <sup>ID</sup> | بابک عبدالمهدی مندولکانی\* <sup>ID</sup> | زینب محمودیان <sup>ID</sup>

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

## چکیده

## اطلاعات مقاله

هدف از این تحقیق مطالعه الگوی بیان نسبی ژن‌های کدکننده عوامل رونویسی *bHLH94*، *bZIP33* و *WRKY46* تحت شرایط کمبود آهن در دو رقم آهن-کارا (پیش‌تاز) و آهن-ناکارا (فلات) گندم نان در دو سطح کمبود و کفایت آهن به ترتیب ۱/۴ و ۱۰ میلی گرم آهن در کیلوگرم خاک بود. در این آزمایش از ریشه و برگ گیاهان به‌طور جداگانه در دو مرحله رویشی (یک ماه پس از کشت) و زایشی (۳۰ درصد سنبله‌دهی) نمونه‌برداری انجام گرفت. میزان بیان نسبی ژن‌ها با استفاده از روش qRT-PCR ارزیابی شد. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر متقابل رقم × بافت × مرحله نمونه‌برداری برای هر سه ژن *bHLH94*، *bZIP33* و *WRKY46* در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. بر اساس نتایج مقایسه میانگین تیمارها تحت تنش کمبود آهن، بیش‌ترین میزان افزایش بیان نسبی ژن *bHLH94* در ریشه رقم پیش‌تاز (آهن-کارا) در مرحله رویشی (بیش از ۴ برابر) و ریشه رقم پیش‌تاز و برگ رقم فلات در مرحله زایشی (بیش از ۲ برابر) و برای ژن *bZIP33* در ریشه رقم پیش‌تاز در مرحله رویشی (بیش از ۲۷ برابر) و همچنین برای ژن *WRKY46* در ریشه در مرحله رویشی (بیش از ۵۰ برابر) در رقم آهن-کارای پیش‌تاز مشاهده شد. با توجه به نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر بیش‌ترین میزان افزایش بیان نسبی ژن‌های کدکننده عوامل رونویسی *bHLH94* و *bZIP33* و *WRKY46* در ریشه رقم پیش‌تاز (آهن-کارا) در شرایط کمبود آهن مشاهده شد. بنابراین به نظر می‌رسد افزایش بیان این عوامل رونویسی در ریشه ارقام روی-کارا گندم نان منجر به افزایش جذب روی از خاک و انتقال آن به دانه و سایر اندام‌ها می‌شود.

نوع مقاله:

مقاله پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۹/۰۶

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۱۲/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۱/۱۶

تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۰۴/۰۹

واژگان کلیدی:

بیان نسبی،

عوامل رونویسی،

کمبود آهن،

گندم نان،

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در

زمان واقعی

کم‌مصرف، تأمین سلامت و تضمین دوام چرخه حیات گیاه است، ولی مدیریت صحیح این عناصر در گیاهان می‌تواند عامل مؤثری در توسعه تحمل گیاه در برابر تنش‌های غیرزیستی باشد (Pessarakli, 2019). در بین عناصر کم‌مصرف، کمبود آهن و روی در ایران بیشترین عوامل محدود کننده تولید محصولات کشاورزی هستند. در ایران حد بحرانی آهن در خاک برای گندم پنج میلی‌گرم بر کیلوگرم گزارش شده است (Malakouti and Homaei, 2004). حدود ۴۰ درصد خاک‌های ایران دارای آهن کمتر از ۵/۵ میلی‌گرم در کیلوگرم می‌باشند (Shahbazi and Besharati, 2013). آهن یک عنصر بسیار کلیدی در ساخت سبزینه گیاهی می‌باشد. این عنصر جزء اصلی ساختار آنزیم‌های مختلف و برخی از رنگدانه‌ها می‌باشد. همچنین آهن در بسیاری از فرآیندهای بیوشیمیایی گیاهان مانند فتوسنتز، تنفس سلولی، متابولیسم کربوهیدرات‌ها و تشکیل آنزیم‌ها نقش مهمی ایفا می‌کند (Khoshgoftarmansh *et al.*, 2012). آهن در خاک‌های قلیایی که حدود ۳۰ درصد از سطح زمین را در بر می‌گیرند کمتر در دسترس است. بسیاری از خاک‌های قلیایی دارای غلظت بی‌کربنات بالایی هستند که می‌تواند مانع از جذب آهن شود (Schuler *et al.*, 2012). در ارتباط با گندم، ساز و کارهایی نظیر ریخت‌شناسی ریشه، تلقیح میکروبی، ترشح فیتوسیدروفورهای متحرک‌کننده آهن و تفاوت در جذب و از همه مهم‌تر عوامل رونویسی فعال‌کننده ژن‌های دخیل در جذب آهن ممکن است در افزایش جذب آهن از خاک توسط گیاهان دخالت داشته باشند. عوامل رونویسی در پاسخ گیاهان به کمبود آهن نقش محوری دارند و با فعال‌سازی مجموعه‌ای از ژن‌های کلیدی، جذب و توزیع آهن را تنظیم می‌کنند. در گیاه *Arabidopsis thaliana*، ژن‌های *IRT1* به‌عنوان ناقل اصلی  $Fe^{2+}$  و *FRO2* به‌عنوان آنزیم احیای  $Fe^{3+}$  در سطح ریشه، مهم‌ترین اجزای سیستم جذب آهن محسوب می‌شوند که بیان آن‌ها به‌طور مستقیم تحت کنترل عوامل رونویسی خانواده‌های *FIT* و *bHLH* (مانند *bHLH38/39/100/101*) قرار دارد (Colangelo and Guerinet, 2004; Bauer *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2013). همچنین ژن *AHA2* با اسیدی‌کردن ریزوسفر حلالیت آهن را افزایش می‌دهد (Santi and Schmidt, 2009). پس از ورود آهن به گیاه، انتقال و جابه‌جایی آن توسط محصولات ژن‌های متعددی صورت می‌گیرد؛ از جمله *YSL* (ناقلین کمپلکس  $Fe-NA$ )، *NAS* (سنتز نیکوتیانامین برای کلاته‌کردن آهن)، *FRD3* (انتقال  $Fe$ )

غلزات نقش بسیار مهمی در تأمین نیاز غذایی مردم جهان دارند که در این میان گندم نان (*Triticum aestivum* L.) مهم‌ترین محصول به‌شمار می‌رود، که در سطح گسترده‌ای از زمین‌های زراعی کشت، تولید و مورد استفاده قرار می‌گیرد (Khoshgoftarmansh *et al.*, 2012). سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد (FAO, 2019) با انتشار گزارشی در خصوص میزان تولید جهانی غلات، اعلام کرد که در سال ۲۰۲۰-۲۰۱۹ تولید غلات در جهان نسبت به سال ۲۰۱۷-۲۰۱۸، ۲/۷ درصد افزایش یافته که در این میان گندم ۷۵۹/۵ میلیون تن از این آمار را به خود اختصاص داده و ۷۳ میلیون تن افزایش نسبت به سال ۲۰۱۸-۲۰۱۷ نشان می‌دهد. در کل جهان، گندم تقریباً ۵۵ درصد از کربوهیدرات‌ها و ۲۰ درصد از کالری غذایی مصرف شده در سطح جهان را تأمین می‌کند. این گیاه وسیع‌ترین سطح زیر کشت را در جهان دارد به‌طوری که در حال حاضر در ۱۷ درصد از زمین‌های زراعی جهان کشت شده و ۳۵ درصد از انرژی و پروتئین جیره غذایی و بیش‌تر از ۲۰ درصد کالری مورد نیاز جمعیت جهان را تأمین می‌کند. از آنجا که گندم بخش قابل‌توجهی از نیاز انرژی و پروتئین را فراهم می‌کند، تغییرات در تولید یا مصرف آن می‌تواند به‌طور مستقیم بر تعادل تغذیه‌ای جمعیت تأثیر بگذارد. در ایران بیش از ۴۰ درصد کالری و همچنین ۵۰ درصد پروتئین مورد نیاز افراد جامعه از طریق گندم نان تأمین می‌شود (Khavarinejad and Babajanov, 2011).

گیاهان به‌طور نامطلوبی تحت تأثیر تنش‌های زیستی و غیرزیستی قرار می‌گیرند. از آنجایی که این تنش‌ها، به شکل‌های گوناگون بر تولید و رشد گیاهان زراعی تأثیرات منفی قابل‌توجهی می‌گذارند؛ بنابراین تنش‌های محیطی یکی از مهم‌ترین عوامل کاهش دهنده عملکرد محصولات کشاورزی در جهان می‌باشند. در صورت عدم وجود تنش‌های محیطی، عملکرد واقعی گیاهان باید برابر با عملکرد بالقوه آنان باشد. در اکثر گیاهان زراعی میانگین عملکرد واقعی گیاهان ۱۰ تا ۲۰ درصد عملکرد بالقوه آنان می‌باشد. از تنش‌های غیرزیستی مهم که باعث کاهش عملکرد در گیاهان می‌شود می‌توان به کمبود عناصر کم‌مصرف در خاک اشاره کرد (Verma *et al.*, 2016). عناصر معدنی برای تشکیل ساختارهای سلولی، فعالیت آنزیمی، انتقال یون‌ها، تنظیم تعادل اسمزی، متابولیسم ثانویه و کارکرد هورمون‌ها ضروری هستند (Taiz *et al.*, 2015; Ranhbar *et al.*, 2023). اگر چه نقش اصلی عناصر

بررسی الگوهای بیان ژن‌های WRKY در شرایط کمبود آهن در گندم نان نشان می‌دهد که بیان تعدادی از همولوگ‌های این ژن نیز به‌طور معنی‌داری در گندم القاء می‌شوند و با تمایل به اتصال به عناصر W-box در پیشبر ژن‌های پاسخ‌دهنده، در تنظیم مسیرهای هموستاتیک آهن و روی دخالت دارند. همچنین تعاملات پروتئینی میان اعضای این خانواده، در یکپارچه‌سازی شبکه‌های پاسخ به کمبود آهن نقش کلیدی دارند (Saini et al., 2025). به‌طور کلی، شواهد نشان می‌دهد که عوامل رونویسی خانواده‌های bHLH, bZIP و WRKY با تعاملات متقابل، شبکه‌های پیچیده‌ای را در تنظیم جذب، انتقال و توزیع آهن (فعال‌سازی ژن‌های دخیل در جذب آهن) تشکیل می‌دهند. پروتئین‌های bHLH به‌طور گسترده-ای در یوکاریوت‌ها مشاهده می‌شوند و گیاهان بالاترین تعداد این عوامل را دارا می‌باشند. این عوامل رونویسی معمولاً بر اساس توالی دمین اتصال شونده DNA با پروتئین، به زیرخانواده‌ها و زیرگروه‌های مختلفی طبقه‌بندی می‌شوند (Jones, 2004). در ژنوم گندم بیش از ۱۵۹ ژن کدکننده عوامل رونویسی bHLH شناسایی شده که نقش گسترده‌ای در تنظیم تنش‌های زیستی و غیرزیستی و به‌ویژه بیان ژن‌های مرتبط با تغذیه معدنی ایفا می‌کند (Wang et al., 2019). همچنین مطالعات نشان داده است که عوامل رونویسی bHLH در گیاه برنج، پاسخ به کمبود آهن مبتنی بر رهیافت II را با القای ژن‌های *Os-IRO2* تنظیم می‌کند (Ogo et al., 2007). لازم به توضیح است که آزاد شدن فیتوسیدروفورها از ریشه گیاهان خانواده گرامینه که به استراتژی II مشهور است، در شرایط کمبود آهن صورت می‌گیرد. این موضوع در تحمل ژنوتیپ‌های گندم به کمبود آهن دخالت دارد (Mastrangelo et al., 2021).

در گیاه آراییدوپسیس نقش عامل رونویسی bHLH به‌عنوان تنظیم‌کننده بالادست ژن *IRT1* (Iron-Regulated Transporter 1)، به‌عنوان یک بخش اساسی از مسیر انتقال پیام کمبود آهن مشخص شده است (Sheng et al., 2019). عامل رونویسی FIT (Fer-like iron-deficiency induced transcription factor) فرآیند جذب آهن و رشد در گیاهان را کنترل می‌کند. باقی‌مانده‌های سرین در انتهای کربوکسیل این پروتئین به FIT اجازه می‌دهند تا با عوامل bHLH زیرگروه Ib مانند bHLH039 تعامل کرده و کمپلکس‌های عوامل رونویسی فعال تشکیل دهد (Trofimov et al., 2024). بیان

citrate به‌آوند چوبی) و OPT3 (بارگذاری آهن به آوند آبکش) (Klatte et al., 2009; Stacey et al., 2008). دو خانواده عوامل رونویسی FIT و bHLH (basic helix-loop-helix) در فعال‌سازی رونوشت‌برداری و بیان این ژن‌ها دخالت دارند. خانواده bZIP (Basic-region leucine zipper) یکی از عوامل رونویسی مهم دیگر می‌باشد که در کنترل بیان تعداد زیادی ژن در زمان تنش ایفای نقش می‌کند (Han et al., 2019). این عوامل رونویسی در تنظیم فرآیندهای زیستی مختلف گیاهان، از جمله بلوغ و جوانه‌زنی بذر، ریخت‌شناسی نوری، القاء و توسعه گل و همچنین پاسخ به تنش‌های محیطی و دفاع بیمارگرها نقش دارند (Alves et al., 2013). همچنین خانواده bZIP در تنظیم جذب آهن و روی از طریق فعال‌سازی ژن‌های دخیل در جذب و انتقال این دو عنصر مانند ژن‌های ZIP نقش دارند (Asadzadeh and Abdollahi, 2024). به‌طور مثال، در *Arabidopsis* ژن‌های bZIP19 عمدتاً در ریشه و bZIP23 در اندام‌های هوایی بیان می‌شوند (Lilay et al., 2019). در گندم نیز تنوع بیان ژن‌های bZIP نشان‌دهنده نقش اختصاصی هر کدام از اعضای این خانواده ژنی در شبکه هموستازی آهن می‌باشد. بررسی‌ها نشان داده‌اند که ژن‌های *bZIP1*, *bZIP3a*, *bZIP3b* و *bZIP4* در پاسخ به کمبود روی در ریشه و ساقه گندم بیان می‌شوند، اما شدت و زمان‌بندی بیان آن‌ها متفاوت است؛ به‌طوری‌که ژن‌های *bZIP3a*, *bZIP3b* و *bZIP4* در مراحل اولیه کمبود روی افزایش بیان چشمگیری دارند، در حالی که *bZIP1* با تأخیر و شدت کمتر بیان می‌شود (Evens et al., 2017). در گیاه جو نیز الگوهای مشابهی در خصوص بیان این ژن‌ها گزارش شده است؛ به‌گونه‌ای که ژن‌های *bZIP1*, *bZIP10* و *bZIP58* در ریشه و اندام‌های هوایی بیان می‌شوند، در حالی که ژن *bZIP57* فقط در ریشه فعال بود و ژن‌های *bZIP56* و *bZIP62* در جو بیان نمی‌شوند. همچنین در گندم افزایش بیان عوامل رونویسی bZIP در ریشه در اثر کمبود آهن گزارش شده است ولی در برگ پرچم کاهش بیان این عوامل گزارش شده است (Wang et al., 2020). این نتایج نشان می‌دهند که اعضای مختلف خانواده‌های ژنی مورد مطالعه در هموستازی جذب آهن نقش‌های یکسانی ندارند و هر کدام در بافت‌ها و اندام‌های مختلف بیان می‌شوند. علاوه‌بر این عوامل رونویسی، خانواده WRKY نیز در پاسخ به کمبود آهن اهمیت ویژه‌ای دارند.

می‌کند (Jin *et al.*, 2016); بنابراین با توجه به اهمیت عوامل رونویسی مذکور در فعال‌سازی رونویسی ژن‌های دخیل در جذب آهن در گیاهان و اینکه تاکنون الگوی بیان ژن‌های کدکننده عوامل رونویسی bHLH94، bZIP33 و WRKY46 تحت شرایط کمبود آهن در گندم نان مطالعه نشده است، در این تحقیق تأثیر کمبود آهن خاک بر بیان ژن‌های کدکننده این عوامل رونویسی در برگ و ریشه ارقام آهن-کارا و آهن-ناکارای گندم نان مورد مقایسه قرار گرفت.

### مواد و روش‌ها

این آزمایش در سال ۱۳۹۹ در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار با استفاده از دو رقم گندم نان آهن-کارا (پیش‌تاز) و آهن-ناکارا (فلات) (Khoshgofarmanesh *et al.*, 2012) در دو سطح آهن ۱/۴ و ۱۰ میلی گرم آهن در کیلوگرم خاک (کمبود و کفایت آهن) انجام شد. خاک مورد استفاده از نواحی دارای کمبود آهن در اطراف ارومیه تهیه، با ال ک ۲ میلی متری الک شده و سپس خصوصیات فیزیکی و شیمیایی، مقدار عناصر ماکرو و میکروبی خاک برای اطمینان از فقر آهن اندازه‌گیری شد (جدول ۱). بذور ارقام مورد کشت پس از ضدعفونی با آب اکسیژنه، در گلدان‌های پلی‌اتیلنی به قطر ۱۱ و ارتفاع ۳۴ سانتی‌متر حاوی ۳ کیلوگرم خاک کشت شدند. سپس در دو مرحله رویشی (یک ماه پس از کشت) و زایشی (۳۰ درصد سنبله‌دهی) از ریشه و برگ گیاهان نمونه برداری شد و جهت انجام مطالعات بیان ژن، در داخل نیتروژن مایع به فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. تیمار آهن بر اساس حد بحرانی آهن در 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 سبکترین به ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک رسانده شد و به‌عنوان تیمار کفایت آهن استفاده شد. ترکیب محلول غذایی که در طول آزمایش به گلدان‌ها داده شد در جدول ۲ آورده شده است.

بیش از حد FIT به‌تنهایی پاسخ‌های مربوط به کمبود آهن را تقویت نمی‌کند، اما بیان FIT همراه با عوامل رونویسی bHLH38، bHLH39 و bHLH101 ژن‌های جذب آهن را فعال کرده و تحمل گیاه نسبت به کمبود آهن را بهبود می‌بخشد (Wang *et al.*, 2013; Yuan *et al.*, 2008).

عوامل رونویسی WRKY نیز در گیاهان در تنظیم بسیاری از فرآیندهای زیستی و غیرزیستی شرکت می‌کنند. نام این خانواده از چهار اسیدآمینو محافظت شده آن شامل تریپتوفان (Tryptophan / W)، آرژینین (Arginine / R)، لیزین (Lysine / K) و تیروزین (Tyrosine / Y) گرفته شده است. نام‌گذاری بر اساس این چهار اسید آمینو شاخص، نشان‌دهنده اهمیت ساختاری و عملکردی آن‌ها در خانواده است و به تشخیص سریع این گروه کمک می‌کند. خانواده ژنی WRKY از شمار ده خانواده بزرگ ژنی می‌باشد که در گیاهان عالی و تمام اجداد گیاهان سبز شناسایی شده‌اند (Eulgem and Somssich, 2007). تحقیقات نشان داده پروتئین‌های WRKY اغلب به عنوان فعال‌کننده و مهارکننده در بسیاری از فرآیندهای مهم گیاهی دخیل هستند (Eulgem and Somssich, 2007). این گروه عوامل رونویسی از یک دامنه پروتئینی ۶۰ تا ۷۰ اسیدآمینوای WRKY تشکیل شده که شامل دمین WRKYGQK و یک ناحیه انگشت روی می‌باشند.

این خانواده نیز در پاسخ به کمبود آهن اهمیت ویژه‌ای دارند. بررسی الگوهای بیان ژن‌های WRKY در شرایط کمبود آهن در گندم نشان داده است که بیان تعدادی از همولوگ‌های این خانواده به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد و با تمایل به اتصال به عناصر W-box در پیشبر ژن‌های پاسخ‌دهنده، در تنظیم مسیرهای هموستاتیک دخالت دارند. همچنین تعاملات پروتئینی میان اعضای این خانواده، در یکپارچه‌سازی شبکه‌های پاسخ به کمبود آهن نقش کلیدی دارند (Saini *et al.*, 2025). در گیاه آرابیدوپسیس عامل رونویسی WRKY46، از طریق غربالگری ۷۲ عضو خانواده WRKY شناسایی شد و از طریق تجزیه و تحلیل جهش ژن‌های دخیل در جذب و انتقال آهن در این گیاه مشخص شد که این عامل رونویسی انتقال آهن از ریشه به ساقه را تقویت

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

Table 1. Physicochemical properties of the soil used in the experiment

اسیدیته	شوری	شن	لای	رس	پتاسیم	آهن	فسفر	کربن آلی	کربنات کلسیم
pH	EC (ds/m)	Sand (%)	Silt (%)	Clay (%)	K (mg/kg)	Fe (mg/kg)	P-O1sen	OC (%)	CCE (%)
7.98	0.89	38	53	9	16	1.4	3.4	0.65	22

جدول ۲- ترکیب محلول غذایی مورد استفاده در این آزمایش

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

عنصر Element	مقدار (میلی‌گرم) Amount (mg)	کود Fertilizer	غلظت (میلی‌گرم بر کیلوگرم) Concentration (mg/kg)
نیترژن (N)	30	اوره (Urea)	65.22
فسفر (P)	50	سوپرفسفات تریپل (Triple superphosphate)	249
پتاسیم (K)	100	سولفات پتاسیم (Potassium sulfate)	223
روی (Zn)	5	سولفات روی (Zinc sulfate)	22.1
مس (Cu)	5	سولفات مس (Copper sulfate)	19.6
آهن (Fe)	10	آهن سکوسترین (Iron sequestrant)	182

میکرولیتر شامل ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت با غلظت ۱۰ میکرومولار، ۶/۲۵ میکرولیتر Maxima SYBR Green/Fluorescein Qpcr Master Mix (2x)، ۴ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز و ۱/۲۵ میکرولیتر cDNA با غلظت ۵۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر بود.

**تجزیه و تحلیل داده‌های بیان ژن:** در واکنش qRT-PCR جهت به‌دست آوردن کمیت نسبی از طریق اندازه‌گیری افزایش تشعشع فلورسنس در نتیجه اتصال رنگ، از نرم‌افزار Rotor-Gene Q استفاده شد. پس از به‌دست آوردن Ct، میزان بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه با روش  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  محاسبه گردید (Pfaffl, 2001). نرمال بودن اشتباهات و داده‌های بیان ژن با روش کلموگراف-اسمیرنوف در نرم‌افزار MINITAB (نسخه ۱۹) بررسی و در نهایت تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون SNK در نرم‌افزار SAS (نسخه ۹/۲) انجام گرفت.

### نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه واریانس بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه در دو رقم گندم نان تحت شرایط کمبود آهن نشان داد که اثر متقابل رقم × بافت × مرحله نمونه‌برداری برای تمامی ژن‌های مورد مطالعه معنی‌دار می‌باشد (جدول ۴).

**بیان ژن *bHLH94*:** نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل رقم × بافت × مرحله نمونه‌برداری تحت تنش کمبود آهن نشان داد که بیش‌ترین میزان افزایش بیان نسبی ژن *bHLH94* مربوط به ریشه رقم آهن-کارای پیش‌تاز در مرحله رویشی (بیش از ۴ برابر) می‌باشد. همچنین در مرحله‌ی زایشی در ریشه همین رقم و در برگ رقم آهن-ناکارا، بیان این ژن بیش از ۲ برابر افزایش یافت (شکل ۱).

**استخراج RNA و سنتز cDNA:** استخراج RNA از ۰/۱ گرم بافت پودر شده ریشه و برگ گیاهان با استفاده از محلول استخراج RNX-plus™ (سیناکلون، ایران) مطابق شیوه‌نامه پیشنهادی شرکت سازنده صورت گرفت. بررسی کمیت و کیفیت RNA استخراجی با استفاده از دستگاه نانودراپ والکتروفورز ژل آگار یک درصد ارزیابی شد. قبل از سنتز cDNA برای حذف DNA ژنومی، از تیمار *DNase I* استفاده شد. ساخت cDNA با استفاده از کیت *RevertAid First Strand cDNA Synthesis* (Thermo Fisher Scientific، امریکا) از دو میکروگرم RNA استخراج شده با استفاده از یک میکرولیتر آغازگر اولیگو dt تا رسیدن به حجم نهایی ۱۲ میکرولیتر مطابق شیوه‌نامه پیشنهادی شرکت سازنده کیت انجام شد. جهت 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) و کنترل مثبت در حین سنتز cDNA در نظر گرفته شد.

**طراحی آغازگرها و واکنش‌های Real time PCR:** برای مطالعه بیان نسبی ژن‌های *bZIP33*، *bHLH94* و *WRKY46*، توالی نواحی کدکننده این ژن‌ها جهت طراحی آغازگرها از بانک اطلاعاتی NCBI (National Center for Biotechnology Information) استخراج گردید. آغازگرها با نرم‌افزارهای Fast PCR و Gene Runner طراحی شدند (جدول ۳).

واکنش Real-time PCR طبق شیوه‌نامه کیت Maxima SYBR Green/Fluorescence qPCR Master Mix (2x)/No Rox (Thermo Fisher Scientific، امریکا) انجام شد. دوره‌های زمانی جهت تکثیر ژن‌های موردنظر، با توجه به توالی آغازگر و اندازه محصول حاصل از تکثیر تعیین شد. ترکیب و مقادیر مورد نیاز جهت واکنش Real-time PCR در حجم ۱۲/۵

جدول ۳- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در واکنش qRT-PCR

نام ژن	شماره دسترسی	توالی آغازگرها (۵' - ۳')	دمای اتصال (سانتی‌گراد)	طول محصول (جفت‌باز)
Gene Name	Accession number	Sequence of primers	Annealing temperature (°C)	Product length (bp)
<i>Actin3</i>	KX533928	F: GACGCACAACAGGTATCGTGTGG R: AGCGAGGTCAAGACGAAGGATG	60	107
<i>bHLH94</i>	AY625684.1	F: GCAGCTGTTCTTGATGGAG R: CCATTCGCAGGCTTCTT	61	116
<i>bZIP33</i>	AT2G12900	F: GAGCCTCGTGTGTGGTTCAGAC R: GTAGCTCCTTGGATTGGGTTTCC	60	114
<i>WRKY46</i>	EF368365.1	F: GTCGCCTCTTCCACCG R: AGGTCGCTGGGGTAGGAAG	62	127

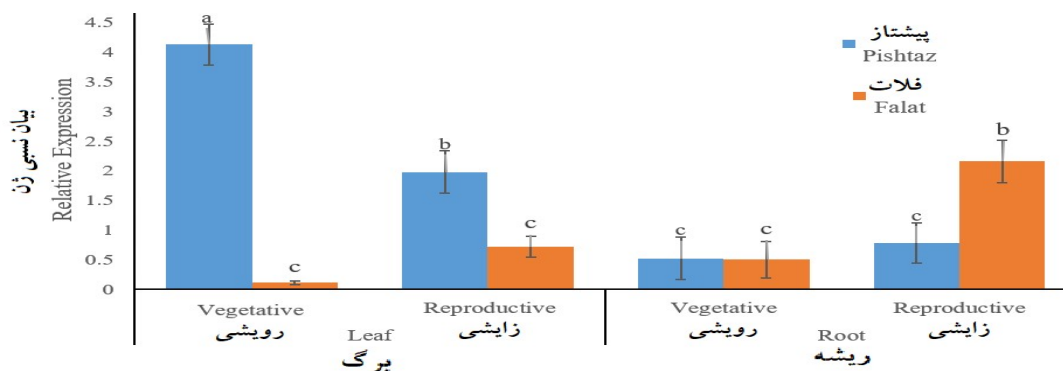
جدول ۴- تجزیه واریانس بیان نسبی ژن‌های *WRKY46*، *bZIP33*، *bHLH94* تحت تنش کمبود آهن در ارقام پیشتاز (آهن-کارا) و فلات (آهن-ناکارا) گندم نان

Table 4. Analysis of variance in the relative expression of *bHLH94*، *bZIP33*، and *WRKY46* genes under iron deficiency stress in bread wheat cultivars Pishtaz (iron-efficient) and Falat (iron-inefficient).

منابع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی D.f	میانگین مربعات (MS)		
		<i>bHLH94</i>	<i>bZIP33</i>	<i>WRKY46</i>
رقم (Cultivar)	1	3.715**	186.73**	164.5**
بافت (Tissue)	1	2.318**	55.35**	398.6**
مرحله (Stage)	1	0.045 <sup>ns</sup>	199.65**	453.5**
بافت × رقم (T × C)	1	11.21**	177.42**	1129.3**
مرحله × رقم (S × C)	1	4.213**	365.95**	1108.6**
مرحله × بافت (S × T)	1	3.054**	178.08**	1732.6**
رقم × بافت × مرحله (C × T × S)	1	0.494*	86.21**	164.5**
خطای آزمایشی (Error)	16	0.066	3.899	7.34
ضریب تغییرات (درصد) Coefficient of variation (%)		18.86	35.47	24.99

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

\*, \*\*, and <sup>ns</sup>: significant at the five and one percent probability levels, and non-significant, respectively.



شکل ۱- مقایسه میانگین اثر متقابل بافت × رقم × مرحله نمونه‌برداری بر بیان نسبی ژن کدکننده عامل رونویسی *bHLH94* تحت تنش کمبود آهن در ارقام پیشتاز (آهن-کارا) و فلات (آهن-ناکارا) گندم نان (ستون‌هایی که دارای حروف مشابه می‌باشند بر اساس آزمون SNK اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد ندارند)

Figure 1. Mean comparison for the interaction effect of tissue × cultivar × sampling stage on the relative expression of the gene encoding the transcription factor *bHLH94* under iron deficiency stress in Pishtaz (iron-efficient) and Falat (iron-inefficient) cultivars of bread wheat (The columns with the same letters do not have a significant difference at the one percent level based on the SNK test)

اندام‌های هوایی را برعهده دارد. عوامل رونویسی خانواده *bHLH*، مانند عامل رونویسی *OsBHLH133*، برای تنظیم ژن‌های مرتبط با هموستازی آهن در گیاه برنج شناخته شده‌اند.

با توجه به افزایش بیان ژن کدکننده عامل رونویسی *bHLH94* در ریشه رقم آهن-کارای گندم نان تحت شرایط کمبود آهن خاک، احتمال می‌رود این عامل رونویسی منجر به افزایش میزان بیان ژن‌هایی گردد که وظیفه جذب آهن از خاک و انتقال آن به

کمبود آهن، کلروز و نقص‌های رشد را نشان می‌دهند. تحقیقات نشان داده‌اند که تغییرات گسترده در الگوی بیان ژن‌ها در اثر فقدان ژن‌های *bHLH100* و *bHLH101* حاکی از آن است که این دو عامل رونویسی، هموستازی آهن را احتمالاً از طریق تنظیم توزیع آهن در بافت‌ها و اندامک‌های گیاهی کنترل می‌کنند (Wang et al., 2013).

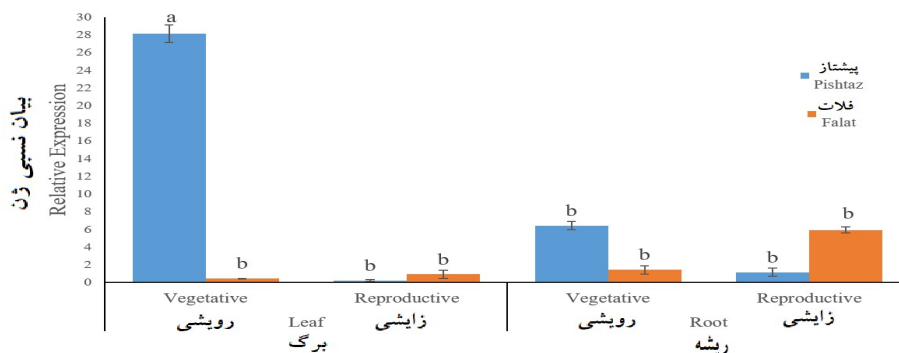
**بیان ژن bZIP33:** نتایج مقایسه میانگین برهم‌کنش رقم × بافت × مرحله نمونه‌برداری تحت تنش کمبود آهن نشان داد که بیش‌ترین میزان افزایش بیان نسبی ژن *bZIP33* (بیش از ۲۷ برابر) مربوط به ریشه رقم آهن-کارای پیش‌تاز در مرحله رویشی بود. در برگ رقم پیش‌تاز در مرحله رویشی و در رقم فلات در مرحله زایشی میزان بیان ژن *bZIP33* افزایش یافت ولی تفاوت معنی‌داری بین ارقام پیش‌تاز و فلات مشاهده نشد. همچنین در ریشه در مرحله زایشی تفاوت معنی‌داری بین ارقام آهن-کارا و آهن-ناکارا به لحاظ میزان بیان این ژن مشاهده نشد (شکل ۲).

با توجه به افزایش بیان ژن کدکننده عامل رونویسی *bZIP33* در ریشه رقم آهن-کارای گندم نان تحت شرایط کمبود آهن خاک، احتمال می‌رود این عامل رونویسی منجر به افزایش میزان بیان ژن‌هایی مانند *ZIP* و *YSL* گردد که وظیفه جذب آهن از خاک و انتقال آن به اندام‌های هوایی را بر عهده دارند. نتایج تحقیقات به‌دست آمده، حاکی بر این امر می‌باشد که ژن *bZIP33* در گندم نان در هر دو رقم آهن-کارا و آهن-ناکارا بیان می‌شود، اما میزان بیان آن تحت شرایط کمبود آهن در رقم آهن-کارای پیش‌تاز بیشتر از رقم آهن-ناکارای فلات می‌باشد. همچنین میزان بیان این ژن در ریشه بیشتر از برگ و نیز به مقدار قابل توجهی در مرحله رویشی بیشتر از مرحله زایشی است. از طرفی بیان این ژن در ریشه و برگ می‌تواند یکی از دلایل آهن-کارایی ارقام باشد. سوزوکی و همکاران (Suzuki et al., 2008) با انجام آزمایشاتی در گیاه برنج دریافتند جذب آهن و روی توسط اعضای خانواده پروتئین ناقل *ZIP* تنظیم می‌شود. همچنین چندین ژن ناقل *ZIP* شامل *IRT1* و *IRT2* که در هموستازی آهن در گیاه برنج نقش دارند گزارش شده است (Zheng et al., 2009). با توجه به اثرات مختلفی که از *bZIP*ها در پاسخ به کمبود روی (Zn) مشاهده شده است، این احتمال وجود دارد که *bZIP*های خاصی به ویژه آن‌هایی که تحت تنش کمبود روی (Zn) بیان پایینی دارند، تنظیم‌کننده سایر *bZIP*ها باشند (Evens et al., 2017). کاویتا و همکاران

وانگ و همکاران (Wang et al., 2019) با مطالعه گیاه برنج (*Oryza sativa*) نقش عوامل رونویسی *bHLH* را در شرایط کمبود آهن بررسی و دریافتند که غیرفعال‌سازی عامل رونویسی *OsBHLH133* در شرایط کمبود آهن در گیاه برنج منجر به تأخیر در رشد و افزایش غلظت آهن در اندام‌های هوایی و کاهش غلظت آهن در ریشه‌ها می‌شود. همچنین بیان بیش از حد عامل رونویسی *OsBHLH133* اثر معکوس داشته و منجر به افزایش غلظت آهن در ریشه و کاهش غلظت آهن در اندام‌های هوایی و همچنین شیره آوند چوبی شد. برای تأیید این الگوی بیانی، نهال‌های برنج ۳ هفته‌ای به مدت ۱۰ روز به محلول‌های مغذی فاقد آهن، منگنز، مس با روی منتقل شدند. همچنین وانگ و همکاران (Wang et al., 2007) چهار ژن از گروه *bHLH* را گزارش کردند که در ارتباط با کمبود آهن در گیاه آراییدوپسیس نقش مهمی دارند و بیان آن‌ها با کمبود آهن تنظیم می‌شود. آن‌ها دریافتند که ژن‌های کدکننده عوامل رونویسی *bHLH038*، *bHLH039*، *bHLH100* و *bHLH101* توسط کمبود آهن در ریشه و برگ تنظیم می‌شوند. آن‌ها با تیمارهای فلزی مانند نیکل، روی بالا و مس منجر به القای هر چهار ژن در آراییدوپسیس شدند در حالی که آهن بالا، مس و روی کم بیان این ژن‌ها را سرکوب کرد. این نتایج نشان داد که چهار ژن خانواده *bHLH* به‌طور مستقل از ژن *FIT* در شرایط کمبود آهن القا می‌شوند و عملکردهای متفاوتی از *FIT* در شرایط کمبود آهن دارند. وانگ و همکاران (Wang et al., 2013) نیز در آراییدوپسیس نشان دادند که از خاموش کردن و از دست رفتن عملکرد *bHLH100/bHLH101* هیچ تأثیری بر بیان ژن *FIT* ندارد و نشان دادند که ژن‌های *bHLH100* و *bHLH101* به‌طور مستقل عمل می‌کنند. به‌منظور بررسی دقیق‌تر مسیرهای مستقل از *FIT* که هموستاز آهن را تنظیم می‌کند، یک جهش دوگانه از دو ژن مستقل از *bHLH100* و *bHLH101* ایجاد کردند. به نظر می‌رسد این گیاهان جهش‌یافته در شرایط کمبود آهن توانایی رشد ندارند و در این شرایط کلروفیل و آهن کمتری جذب و انباشته می‌کنند. با این حال، *bHLH100* و *bHLH101* نقش مهمی در پاسخ گیاه به کمبود آهن بازی می‌کنند، زیرا جهش یافته‌های دوگانه *bHLH100/bHLH101* نشانه‌های معمول

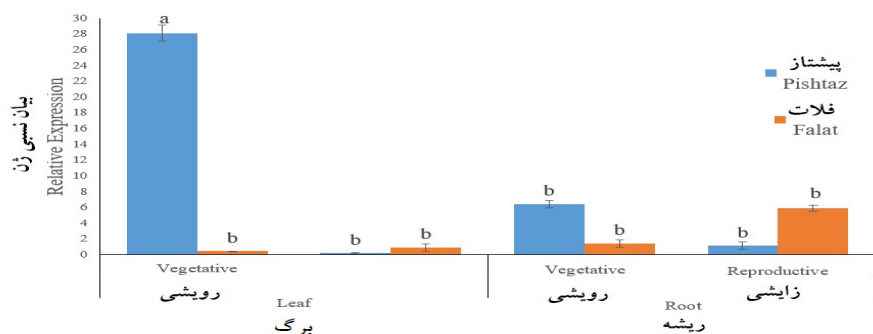
بیان ژن کدکننده عامل رونویسی *WRKY46*: نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل رقم × بافت × مرحله نمونه‌برداری حاکی از افزایش بیان نسبی ژن کدکننده عامل رونویسی *WRKY46* تحت شرایط کمبود آهن در ریشه رقم آهن-آهن-کارای پیشتاز (بیش از ۵۰ برابر) در مرحله رویشی می‌باشد. همچنین این افزایش به‌طور معنی‌داری در رقم پیشتاز بیشتر از فلات بود. در برگ رقم فلات نیز در مرحله زایشی میزان بیان این ژن در رقم آهن-ناکارا به‌طور معنی‌داری بیشتر از رقم آهن-کارا افزایش یافت. همچنین در مرحله زایشی در ریشه و در مرحله رویشی در برگ اختلاف معنی‌داری میان دو رقم به لحاظ میزان بیان این ژن مشاهده نشد (شکل ۳).

(Kavitha et al., 2015) با انجام آزمایشاتی روی برنج دریافتند که عامل رونویسی ZIP6 در اندام هوایی و ریشه در پاسخ به کمبود  $Zn^{2+}$ ،  $Fe^{2+}$  و  $Mn^{2+}$  فعال می‌شود. ژن ZIP6 در تخمک برنج در شرایط کمبود آهن نیز بیان می‌شود (Klepikova et al., 2016). تیموری راد و همکاران (Teymouri Rad et al., 2022) نشان دادند که عامل رونویسی bZIP56 احتمالاً با افزایش بیان ZIPها در تحمل به تنش کمبود روی ایفای نقش می‌کند. در نهایت با بیان اینکه عامل رونویسی bZIP33 احتمالاً با افزایش بیان ZIPها و یا با تأثیر بر bZIPهای دیگر در تحمل به تنش کمبود آهن ایفای نقش کرده و بر اساس نتایج به نظر می‌رسد یکی از دلایل آهن-کارایی گیاهان، مربوط به بیان ژن‌های کدکننده این عامل رونویسی در ریشه و در نتیجه انتقال آهن از خاک به گیاه باشد.



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل بافت × رقم × مرحله نمونه‌برداری بر بیان نسبی ژن کدکننده عامل رونویسی *bZIP33* تحت تنش کمبود آهن در ارقام پیشتاز (آهن-کارا) و فلات (آهن-ناکارا) گندم نان (ستون‌هایی که دارای حروف مشابه می‌باشند بر اساس آزمون SNK اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد ندارند)

Figure 2. Comparison of the average interaction effect of tissue × variety × sampling stage on the relative expression of the gene encoding the transcription factor bZIP33 under iron deficiency stress in the Pishtaz (iron-efficient) and Falat (iron-inefficient) cultivars of bread wheat (The columns with the same letters do not have a significant difference at the one percent level based on the SNK test)



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل بافت × رقم × مرحله نمونه‌برداری بر بیان نسبی ژن کدکننده عامل رونویسی *WRKY46* تحت تنش کمبود آهن در ارقام پیشتاز (آهن-کارا) و فلات (آهن-ناکارا) گندم نان (ستون‌هایی که دارای حروف مشابه می‌باشند بر اساس آزمون SNK اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد ندارند)

Figure 3. Mean comparison for the interaction effect of tissue × cultivar × sampling stage on the relative expression of the genes encoding the transcription factor WRKY46 under iron deficiency stress in bread wheat cultivars Pishtaz (iron-efficient) and Falat (iron-inefficient) (The columns with the same letters do not have a significant difference at the 0.01 probability level based on the SNK test)

عوامل رونویسی WRKY به‌عنوان یکی از بزرگ‌ترین خانواده‌های تنظیم‌کننده رونویسی در گیاهان، بخش‌های جدایی‌ناپذیر شبکه‌های انتقال پیام را تشکیل می‌دهند و بسیاری از فرآیندهای گیاهی را تنظیم می‌کنند (Rushton *et al.*, 2010). اعضای خانواده پیچیده عوامل رونویسی WRKY در تنظیم برنامه‌ریزی رونویسی ژن‌های مرتبط با پاسخ‌های ایمنی گیاه نقش دارند و شواهد ژنتیکی مستقیماً اهمیت آن‌ها را به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های مثبت و منفی مقاومت در برابر بیماری اثبات می‌کند. مشخص شده که ژن‌های WRKY از نظر عملکردی به هم متصل هستند و یک شبکه رونویسی متشکل از حلقه‌های بازخورد مثبت و منفی تشکیل می‌دهند (Eulgem and Somssich, 2007). تجزیه و تحلیل بیان ژن‌های گندم، عملکردهای احتمالی عوامل رونویسی WRKY در گندم در طول نمو و همچنین تحت تنش‌های زیستی و غیرزیستی متعدد را نشان می‌دهد (Ning *et al.*, 2017). نتایج تحقیق به‌دست آمده، نشان می‌دهد که ژن WRKY46 در گندم نان در هر دو رقم آهن-کارا و آهن-ناکارا بیان می‌شود، اما میزان بیان آن تحت شرایط کمبود آهن در ریشه رقم آهن-کارا پیش‌تاز در مرحله رویشی بیشتر از همان مرحله در رقم آهن-ناکارا فلات می‌باشد. بیان بیشتر ژن WRKY46 در رقم آهن-ناکارا در مرحله ی زایشی در برگ احتمالاً نشان‌دهنده این امر باشد که این رقم از عوامل رونویسی دیگری که در فعال‌سازی ژن‌های دخیل در جذب آهن نقش دارند، برای افزایش بیان این ژن‌ها استفاده می‌کند. همچنین میزان بیان این ژن در ریشه بیشتر از برگ و نیز به مقدار قابل‌توجهی در مرحله رویشی بیشتر از مرحله زایشی است. با توجه به افزایش بیان ژن کدکننده عامل رونویسی WRKY46 در ریشه احتمال می‌رود این عامل رونویسی منجر به افزایش میزان بیان ژن‌هایی شود که وظیفه جذب آهن از خاک و انتقال آن به اندام‌های هوایی را برعهده دارند. از طرفی بیان این ژن در ریشه و برگ می‌تواند یکی از دلایل آهن-کارایی ارقام باشد. جین و همکاران (Jin *et al.*, 2016) با انجام آزمایشاتی برای پی‌بردن به نقش عوامل رونویسی در پاسخ به کمبود آهن در گیاه آراییدوپسیس، از دو آلل جهش یافته wrky46-1 و wrky46-2 بهره بردند که نشان داد بیان ژن WRKY46 در ریشه

گیاهانی که در آن‌ها از آلل‌های جهش یافته استفاده نشده است، در محیط بدون آهن به مقدار چشمگیری افزایش پیدا کرده و بنابراین نقش این عامل رونویسی در پاسخ به کمبود آهن در گیاه آراییدوپسیس ثابت شد. همچنین نشان دادند که عامل رونویسی WRKY46 به‌طور قابل‌توجهی بر انتقال آهن از ریشه به ساقه تاثیر می‌گذارد و با تجزیه و تحلیل بیان ژن نشان دادند که بیان یک ژن شبه‌ندولین (VACUOLAR IRON TRANSPORTER1-LIKE1) به‌طور چشمگیری در جهش یافته wrky46-1 افزایش یافته است و بیان VITL1 توسط کمبود آهن مهار شد، در حالی که بیان WRKY46 در ریشه القا می‌شود. WRKY75 یکی از چندین عضو از خانواده عامل رونویسی WRKY است که گزارش شده است که در تنظیم پاسخ به کمبود مواد مغذی نقش دارد. تحقیقات انجام شده در گیاه آراییدوپسیس روی عامل رونویسی WRKY75 نشان دادند که عامل رونویسی مذکور در شرایط کمبود فسفات نیز در ریشه بیان می‌شود (Devaiah *et al.*, 2007).

با توجه به نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر بیش‌ترین میزان افزایش بیان نسبی ژن‌های کدکننده عوامل رونویسی bHLH94، bZIP33 و WRKY46 در ریشه رقم آهن-کارا پیش‌تاز در شرایط کمبود آهن مشاهده شد؛ بنابراین احتمال می‌رود این عوامل رونویسی منجر به افزایش میزان بیان ژن‌هایی مانند ZIP و YSL شود که وظیفه جذب آهن از خاک و انتقال آن به اندام‌های هوایی و همچنین جابجایی آهن از برگ به سایر اندام‌ها را برعهده داشته باشند. همچنین بیش‌ترین میزان افزایش بیان نسبی ژن کدکننده عامل رونویسی bHLH94 در ریشه رقم آهن-کارا پیش‌تاز در مرحله رویشی مشاهده شد. افزایش بیان این ژن در برگ رقم آهن-ناکارا فلات در مرحله زایشی بطور معنی‌داری بیشتر از رقم آهن-کارا بود. بیشترین میزان افزایش بیان نسبی ژن کدکننده عامل رونویسی bZIP33 در ریشه رقم آهن-کارا پیش‌تاز در مرحله رویشی مشاهده شد. همچنین بیشترین افزایش بیان نسبی ژن کدکننده عامل رونویسی WRKY46 به‌طور قابل‌توجهی مربوط به ریشه رقم آهن-کارا پیش‌تاز در مرحله رویشی می‌باشد. میزان بیان این ژن در ریشه بیشتر از برگ و نیز در مرحله رویشی بیشتر از زایشی است.

## References

- Alves, M.S., Dadalto, S.P., Gonçalves, A.B., De Souza, G.B., Barros, V.A.R. and Fietto, L.G. (2013). Transcription factor bZIP: Plant biology and stress responses. *Plant Cell Reports*, 32(7): 1025–1038.
- Asadzadeh, F. and Abdollahi Mandoulakani, B. (2024). The Effect of iron deficiency on the expression of genes encoding transcription factors bZIP4, bZIP79, and bZIP97 in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Genetic Research*, 11(1): 1-14 (In Persian). <http://doi.org/10.22034/PGR.11.1.1>
- Bauer, P., Ling, H.Q. and Guerinot, M.L. (2007). FIT, the master regulator of iron deficiency responses in Arabidopsis. *Trends in Plant Science*, 12(9): 444–448.
- Colangelo, E.P. and Guerinot, M.L. (2004). The essential basic helix-loop-helix protein FIT1 is required for the iron deficiency response. *The Plant Cell*, 16(12): 3400–3412.
- Devaiah, B.N., Karthikeyan, A.S. and Raghothama, K.G. (2007). WRKY75 transcription factor is a modulator of phosphate acquisition and root development in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 143(4): 1789-1801. <https://doi.org/10.1104/pp.106.093971>
- Eulgem, T. and Somssich, I.E. (2007). Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(4): 366-371. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.04.020>
- Evens, N.P., Buchner, P., Williams, L.E. and Hawkesford, M.J. (2017). The role of ZIP transporters and group F bZIP transcription factors in the Zn-deficiency response of wheat (*Triticum aestivum*). *The Plant Journal*, 92(2): 291-304. <https://doi.org/10.1111/tbj.13655>
- FAO. (2019). Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database. Available online: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Accessed on 23 June 2021.
- Han, Y., Fan, T., Zhu, X., Wu, X., Ouyang, J., Jiang, L. and Cao, S. (2019). WRKY12 represses GSH1 expression to negatively regulate cadmium tolerance in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*, 99(1): 149-159. <https://doi.org/10.1007/s11103-018-0809-7>
- Jin, J., Zhang, H., Kong, L., Gao, G. and Luo, J. (2016). Plant TFDB 3.0: a portal for the functional and evolutionary study of plant transcription factors. *Nucleic Acids Research*, 42(D1): D1182-D1187. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1016>
- Jones, S. (2004). An overview of the basic helix-loop-helix proteins. *Genome Biology*, 5(6): 1-6.
- Klatte, M., Schuler, M., Wirtz, M., Fink-Straube, C., Hell, R. and Bauer, P. (2009). The analysis of Arabidopsis nicotianamine synthase mutants reveals functions for nicotianamine in seed iron loading and iron deficiency responses. *Plant Physiology*, 150(1): 257–271. <https://doi.org/10.1104/pp.109.136374>
- Kavitha, P.G., Kuruvilla, S. and Mathew, M.K. (2015). Functional characterization of a transition metal ion transporter, OsZIP6 from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 97: 165-174. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.10.005>
- Khavarinejad, M.S. and Babajanov, A.V. (2011). Identification of relationships of quantitative and morphological traits to spring wheat genotype yields in drought levels of Mazandaran (north of Iran). *International Journal of Agricultural Science*, 1: 329-339.
- Khoshgofarmanesh, A.H., Razizadeh, E.S., Eshghizadeh, H.R., Sharifi, H.R., Savaghebi, G.H., Afiuni, D. and Tadayonnejad, M. (2012). Comparison of different spring wheat genotypes based on their response to iron fertilization in a calcareous soil. *Agricultural Research of Iran*, 16(1): 203-216.
- Klepikova, A.V., Kasianov, A.S., Gerasimov, E.S., Logacheva, M.D. and Penin, A.A. (2016). A high-resolution map of the Arabidopsis thaliana developmental transcriptome based on RNA-seq profiling. *The Plant Journal*, 88(6): 1058-1070. <https://doi.org/10.1111/tbj.13312>
- Lilay, G.H., Castro, P.H., Campilho, A.A. and Ssuncão, A.G. (2019). The Arabidopsis bZIP19 and bZIP23 activity requires zinc deficiency—insight on regulation from complementation lines. *Frontiers in Plant Science*, 22: 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01955>
- Malakouti, M.J. and Homae, M. (2004). Soil fertility of arid and semi-arid regions (Difficulties and Solutions). Tarbiat Modares University Press, Tehran, IR (In Persian).
- Mastrangelo, A.M. and Cattivelli, L. (2021). What makes bread and durum wheat different? *Trends in Plant Science*, 26(7): 677–684. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.01.004>
- Ning, P., Liu, C., Kang, J. and Lv, J. (2017). Genome-wide analysis of WRKY transcription factors in wheat (*Triticum aestivum* L.) and differential expression under water deficit condition. *Peer Journal*, 5: e3232. <https://doi.org/10.7717/peerj.3232>
- Ogo, Y., Nakanishi Itai, R., Nakanishi, H., Kobayashi, T., Takahashi, M., Mori, S. and Nishizawa, N.K. (2007). The rice bHLH protein OsIRO2 is an essential regulator of the genes involved in Fe uptake under Fe-deficient conditions. *The Plant Journal*, 51(3): 366-377. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03149.x>
- Pessaraki, M. (2019). *Handbook of Plant and Crop Stress*. CRC Press, Florida, USA. <https://doi.org/10.1201/9781351104609>
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9): e45-e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Ranhbar, F., Abdollahi Mandoulakani, B. and Ghasemzadeh, R. (2023). The effect of iron deficiency on the relative expression of genes encoding catalase, ascorbate peroxidase and polyphenol oxidase enzymes in bread wheat. *Plant Genetic Research*, 10(1): 145-156 (In Persian). <http://dx.doi.org/10.22034/pgr.10.1.9>

- Rushton, P.J., Somssich, I.E., Ringler, P. and Shen, Q.J. (2010). WRKY transcription factors. *Trends in Plant Science*, 15(5): 247-258. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.02.006>
- Santi, S. and Schmidt, W. (2009). Dissecting iron deficiency-induced proton extrusion in Arabidopsis roots. *New Phytologist*, 183(4): 1072–1084. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02908.x>
- Saini, S., Verma, G., Rav, B.R., Sharma, P., Satbhai, S.B. and Pandey, A.K. (2025). Differential regulation and interactions of wheat WRKY transcription factor homoeologs in modulating iron deficiency response. *Plant Biology*, <https://doi.org/10.1111/plb.70085> <https://doi.org/10.1111/plb.70085>
- Schuler, M., Rellán-Álvarez, R., Fink-Straube, C., Abadía, J. and Bauer, P. (2012). Nicotianamine functions in the phloem-based transport of iron to sink organs, in pollen development and pollen tube growth in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 24(6): 2380-2400. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.099077>
- Shahbazi, K. and Besharati, H. (2013). Overview of agricultural soil fertility status of Iran. *Journal of Land Management*, 2(1): 15-30 (In Persian).
- Sheng, Y., Yan, X., Huang, Y., Han, Y., Zhang, C., Ren, Y. and Cao, S. (2019). The WRKY transcription factor, WRKY13, activates PDR8 expression to positively regulate cadmium tolerance in Arabidopsis. *Plant Cell and Environment*, 42(3): 891-903. <https://doi.org/10.1111/pce.13457>
- Stacey, M.G., Patel, A., McClain, W.E., Mathieu, M., Remley, M., Rogers, E.E., Gassmann, W., Blevins, D.G. and Stacey, G. (2008). The Arabidopsis AtOPT3 protein functions in metal homeostasis and movement of iron to developing seeds. *Plant Physiology*, 146(2): 589–601. <https://doi.org/10.1104/pp.107.108183>
- Suzuki, M., Tsukamoto, T., Inoue, H., Watanabe, S., Matsushashi, S., Takahashi, M. and Nishizawa, N.K. (2008). Deoxymugineic acid increases Zn translocation in Zn-deficient rice plants. *Plant Molecular Biology*, 66(6): 609-617. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9292-x>
- Taiz, L., Zeiger, E., Möller, I.M. and Murphy, A. (2015). *Plant Physiology and Development*. Oxford University Press, Cary, NC, USA.
- Teymouri Rad, L., Fayaz Moghaddam, A., Abdollahi Mandoulakani, B. and Wehbi, E. (2022). Expression pattern of genes encoding bZIP56, WRKY1 and NAM-B1 transcription factors under Zn deficiency conditions in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Crop Breeding*, 14(42): 106-116 (In Persian). <https://doi.org/10.52547/jcb.14.42.106>
- Trofimov, K., Gratz, R., Ivanov, R., Stahl, Y., Bauer, P. and Brumbarova, T. (2024). FER-like iron deficiency-induced transcription factor (FIT) accumulates in nuclear condensates. *Journal of Cell Biology*, 223(4): e202311048. <https://doi.org/10.1083/jcb.202311048>
- Verma, R., Chawla, S. and Dhankar, M. (2016). Importance of micronutrient supplementation programme in childhood to reduce child mortality: the haryana experience. *International Journal of Preventive Medicine*, 12(7): 87-90. <https://doi.org/10.4103/2008-7802.184501>
- Wang, H.Y., Klatte, M., Jakoby, M., Bäumllein, H., Weisshaar, B. and Bauer, P. (2007). Iron deficiency-mediated stress regulation of four subgroup Ib BHLH genes in Arabidopsis thaliana. *Planta*, 226(4): 897-908. <https://doi.org/10.1007/s00425-007-0535-x>
- Wang, M., Gong, J. and Bhullar, N.K. (2020). Iron deficiency triggered transcriptome changes in bread wheat. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18: 2709-2722. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.09.009>
- Wang, M., Kawakami, Y. and Bhullar, N.K. (2019). Molecular analysis of iron deficiency response in hexaploid wheat. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 3: 67. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2019.00067>
- Wang, N., Cui, Y., Liu, Y., Fan, H., Du, J., Huang, Z. and Ling, H.Q. (2013). Requirement and functional redundancy of Ib subgroup bHLH proteins for iron deficiency responses and uptake in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant*, 6(2): 503-513. <https://doi.org/10.1093/mp/sss089>
- Wang, L., Xiang, L., Hong, J., Xie, Z., and Li, B. (2019). Genome-wide analysis of bHLH transcription factor family reveals their involvement in biotic and abiotic stress responses in wheat (*Triticum aestivum* L.). *3 Biotech*, 9(6): 236. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1742-4>
- Yuan, Y., Wu, H., Wang, N., Li, J., Zhao, W., Du, J. and Ling, H.Q. (2008). FIT interacts with AtbHLH38 and AtbHLH39 in regulating iron uptake gene expression for iron homeostasis in Arabidopsis. *Cell Research*, 18(3): 385- 397. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.26>
- Zheng, L., Huang, F., Narsai, R., Wu, J., Giraud, E., He, F. and Shou, H. (2009). Physiological and transcriptome analysis of iron and phosphorus interaction in rice seedlings. *Plant Physiology*, 151(1): 262- 274. <https://doi.org/10.1104/pp.109.141051>