

(مقاله پژوهشی)

## تحقیقات غلات

دوره دهم / شماره دوم / تابستان ۱۳۹۹ (۱۱۹-۱۰۳)

## بررسی برخی ویژگی‌های جوانه‌زنی، صفات بیوشیمیایی و میزان بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدان در ژنوتیپ‌های گندم نان در مرحله گیاهچه‌ای تحت تنش فلز جیوه

حوریه نجفی<sup>۱</sup>، سعید نواب‌پور<sup>۲\*</sup> و خلیل زینلی‌نژاد<sup>۳</sup>

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۵/۰۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۱/۳۱

## چکیده

آلودگی با فلزات سنگین یکی از مهم‌ترین عوامل جهانی آلودگی خاک است. آلاینده‌های فلزی به دلیل غیر قابل تجزیه بودن و آثار فیزیولوژیک آن‌ها بر موجودات زنده و انسان، حتی در غلظت‌های کم سرطان‌زا هستند. جوانه‌زنی بذر، یکی از مهم‌ترین مراحل در چرخه زندگی گیاهان است که به عوامل محیطی از قبیل تنش‌های زیستی و غیرزیستی واکنش نشان می‌دهد. هدف از اجرای این آزمایش، ارزیابی ویژگی‌های جوانه‌زنی، صفات بیوشیمیایی و بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدان در ژنوتیپ‌های گندم نان در مرحله گیاهچه‌ای تحت تنش فلز جیوه بود. آزمایش به صورت کرت‌های خرد شده در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد که در آن تنش جیوه در چهار سطح (شامل بدون کاربرد به عنوان شاهد و کاربرد ۵، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار کلرید جیوه) و ژنوتیپ گندم در سه سطح (شامل گنبد، مروارید و لاین N9108) به ترتیب به عنوان عامل اصلی و فرعی آزمایش در نظر گرفته شدند. نتایج نشان داد که با افزایش میزان تنش کلرید جیوه، شاخص‌های جوانه‌زنی و صفات مورفولوژی و بیوشیمیایی در هر سه ژنوتیپ گندم روندی کاهشی داشت و میزان این کاهش به طور معنی‌داری در ژنوتیپ‌های مختلف، متفاوت بود. لاین N9108 از لحاظ همه صفات اندازه‌گیری شده، شرایط بهتری نسبت به دو ژنوتیپ دیگر تحت تنش فلز جیوه داشت. میزان بیان ژن سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز نیز در لاین N9108 بیش‌تر از ژنوتیپ‌های دیگر بود که می‌تواند نشان‌دهنده برتری این لاین نسبت به دو ژنوتیپ دیگر گندم تحت شرایط تنش کلرید جیوه باشد.

**واژه‌های کلیدی:** آلودگی خاک، پراکسیداز، تنش‌های غیرزیستی، سوپراکسید دیسموتاز، فلزات سنگین

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۲- دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۳- استادیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

\* نویسنده مسئول: [s.navabpour@gau.ac.ir](mailto:s.navabpour@gau.ac.ir)

## مقدمه

در زندگی گیاهان هستند، بنابراین سمیت فلز می‌تواند یکی از مهم‌ترین عوامل کنترل‌کننده جوانه‌زنی و رشد گیاهان باشد (Houshmandfar and Moraghebi, 2011). به‌طور کلی، کاهش جوانه‌زنی بستگی به غلظت فلزات دارد و جوانه‌زنی به دو طریق، شامل جذب آب و سمیت کلی بذرها، می‌تواند تحت تاثیر فلزات قرار گیرد (Kraner and Colville, 2011). زیاده‌شدن جیوه در محیط رشد گیاه و سمیت این فلز، موجب کاهش پتانسیل آبی، توقف رشد ریشه و ساقه، اختلال در تغذیه گیاه، تغییر در تراوایی غشای سلولی، کاهش در تولید پروتئین و جوانه‌زنی می‌شود (Zhou et al., 2008).

با توجه به اهمیت گندم به‌عنوان یک محصول استراتژیک و با توجه به اینکه جوانه‌زنی از حساس‌ترین مراحل رشد گندم است و بهبود این فرآیند در زنده‌مانی و استقرار گیاهچه‌ها اهمیت قابل‌توجهی دارد، بنابراین بررسی عوامل موثر بر درصد و سرعت جوانه‌زنی و سایر شاخص‌های مربوطه ضروری است. در این راستا، آزمایش حاضر به‌منظور بررسی ویژگی‌های جوانه‌زنی و برخی صفات مورفولوژی و بیوشیمیایی و ارزیابی بیان ژن‌های پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در سه ژنوتیپ گندم نان تحت تنش کلرید جیوه انجام شد.

## مواد و روش‌ها

مواد گیاهی این آزمایش، سه ژنوتیپ گندم نان شامل گنبد، مروارید و لاین N9108 بود. لاین N9108 از مرکز تحقیقات بین‌المللی ذرت و گندم (CIMMYT) با شجره PFAU/Milan/5/Chen/Aegilops squarosa (Taus) (//BCN /3/VEE#7/BOW/4/Pastor) قبلاً وارد کشور شده و مورد ارزیابی عملکرد قرار گرفته بود. آزمایش در آزمایشگاه دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان در قالب کرت‌های خردشده با طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار در دو بخش (شامل شاخص‌های جوانه‌زنی و صفات مورفولوژی، بیوشیمیایی و بیان ژن‌ها در مرحله گیاهچه‌ای) انجام شد.

جهت ارزیابی شاخص‌های جوانه‌زنی (درصد جوانه‌زنی، درصد گیاهچه نرمال، طول گیاهچه و بنیه گیاهچه)، ابتدا بذر ژنوتیپ‌های مورد مطالعه به‌مدت چهار دقیقه در محلول هیپوکلرید سدیم یک درصد ضدعفونی و به‌طور کامل با آب دیونیزه شسته شد. سپس تعداد ۲۵ عدد بذر از هر ژنوتیپ درون ظروف پتری روی دو لایه کاغذ صافی استریل قرار گرفته

گندم نان (*Triticum aestivum* L.) گیاهی یک‌ساله از خانواده غلات و جنس تریتیوکوم است و بیش‌ترین سطح زیر کشت را در بین تمامی گیاهان زراعی در جهان دارد. بر اساس تعداد کروموزوم در سه گروه دیپلوئید، تتراپلوئید و هگزاپلوئید قرار می‌گیرد (Moaveni, 2007). با صنعتی‌شدن جوامع، ترکیبات سمی زیادی در محیط آزاد شده است. تنش‌های غیرزیستی از جمله فلزات سنگین باعث ایجاد خسارت‌های زیادی به گندم می‌شوند. در بین فلزات سنگین، فلز جیوه به‌عنوان سمی‌ترین فلز در محیط زیست شناخته شده است. این فلز از مهم‌ترین آلاینده‌های محیطی است که سمیت آن به‌دلایل تغذیه‌ای، اکولوژیک، تکاملی و محیطی، مشکل بزرگی برای موجودات زنده و به‌ویژه برای انسان به‌وجود می‌آورد (Amani, 2008). جیوه با تجمع در دیواره سلولی و ورود به سیتوپلاسم، موجب تنش اکسیداتیو می‌شود و به‌دنبال آن، رادیکال‌های فعال اکسیژن (ROS) در گیاهان تولید و باعث آسیب ساختار لیپیدهای غشایی و متابولیسم سلولی می‌شود (Zhou et al., 2008). گیاهان سازوکارهای مختلفی برای کاهش آثار زیان‌بار رادیکال‌های آزاد اکسیژن دارند که از جمله این سازوکارها، تولید ترکیبات آنزیمی و غیرآنزیمی است (Mishra et al., 2009). اجزای آنزیمی سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی شامل آنزیم‌هایی مانند سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز، آسکوربیت پراکسیداز و کاتالاز هستند (Sharma et al., 2012). وجود فلزات سنگین در محیط زیست، سبب ایجاد تغییرات فیزیولوژیک در گیاهان می‌شود و می‌تواند باعث کاهش قدرت جوانه‌زنی و رشد گیاه و در غلظت‌های بالا سبب از بین رفتن گیاه شود. گیاهان حساس در چنین شرایطی آسیب می‌بینند و از بین می‌روند، در حالی‌که گیاهان مقاوم همچنان به تولید مثل و رشد خود ادامه می‌دهند (Sobral-Souza et al., 2014).

جوانه‌زنی بذر یکی از مراحل مهم چرخه رشدی گونه‌های گیاهی است، زیرا تضمین‌کننده استقرار موفق گیاه و عملکرد نهایی آن است. جوانه‌زنی بذر شامل انتقال مواد ذخیره‌ای به محور جنین، آغاز فعالیت‌های متابولیک و رشد آن است. این مرحله از زندگی گیاهان زراعی، نقش مهمی در استقرار مناسب گیاه و عملکرد نهایی آن دارد (Ghiyasi et al., 2010). از آنجایی که جوانه‌زنی و استقرار گیاهچه، از مراحل آسیب‌پذیر

مخلوط شد. منحنی تغییرات جذب در طول موج ۴۲۵ نانومتر با استفاده از دستگاه جذب نوری مدل Uvikon-Kontron قرائت شد. برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز، ۱/۵ میلی‌لیتر بافر تریس با ۰/۴ میلی‌لیتر پیروگالل و ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی به‌خوبی مخلوط و به‌مدت ۵ دقیقه در بن‌ماری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار گرفت و منحنی تغییرات جذب در طول موج ۴۲۰ نانومتر با استفاده از دستگاه جذب نوری قرائت شد. برای ارزیابی فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز از روش جیانوپولیتیس و ریس (Giannopolitis and Ries, 1977) استفاده شد، به‌این صورت که یک گرم نمونه کوبیده شده و یخ‌زده یکنواخت انتخاب و مقدار ۰/۱ آن با سه میلی‌لیتر محلول واکنش شامل (بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار و pH=۷/۸، متیونین ۱۳ میلی‌مولار، تترازیلوم ۷۵ میکرومولار، ریپوفلاوین ۲ میکرومولار، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار و آنزیم استخراج ۱۰۰ میکرولیتر) مخلوط و یکنواخت شد و به‌مدت ۱۵ دقیقه در شرایط نوری ۵۰۰۰ لوکس قرار گرفت. کالیبراسیون با افزودن یک واحد آنزیم سوپراکسید برای احیای ۵۰ درصد تترازیلوم انجام و میزان فعالیت آنزیم در طول موج ۵۶۰ نانومتر توسط دستگاه جذب نوری قرائت شد.

برای ارزیابی بیان ژن‌ها، ابتدا RNA کل با استفاده از بافر استخراج پی‌بایوزول شرکت بیوفلکس (توکيو، ژاپن) استخراج و کیفیت RNA استخراج‌شده با الکتروفورژل آگارز ۱/۵ درصد تعیین شد. سنتز cDNA با روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز صورت گرفت (در این روش از آنزیم Dnase I برای حذف قطعات DNA استفاده شد) و با آغازگرهای ژن خانه‌دار *GAPDH* و استفاده از PCR، cDNA سنتز شده مورد آزمون قرار گرفت (Kazemi et al., 2010). آغازگرهای مورد نیاز با استفاده از نرم‌افزار Primer3 بر اساس اطلاعات موجود در سایت NCBI طراحی شدند. برای ارزیابی الگوی تظاهر ژن‌های مورد مطالعه (سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز) از دستگاه iQ5 شرکت BioRad و کیت سایبر بیوپارس که قادر به ارزیابی در زمان واقعی است (Real Time PCR) استفاده شد. اطلاعات بیان ژن به نرم‌افزار REST منتقل و تجزیه داده‌ها انجام شد. رسم نمودارها با نرم‌افزار Excel 2016 و تجزیه واریانس داده‌ها با نرم‌افزار SAS 9.2 انجام شد. برای داده‌های بیان ژن، فقط مقایسه میانگین‌ها ارائه شد.

و به پتری‌ها ۵ میلی‌لیتر محلول ۵، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار کلرید جیوه اضافه شد. برای هر ژنوتیپ، یک تیمار شاهد نیز در نظر گرفته و در پتری مربوطه ۵ میلی‌لیتر آب مقطر (محلول صفر کلرید جیوه) اضافه شد. هر پتری به‌عنوان یک واحد آزمایشی (یک تکرار) بود و برای هر ژنوتیپ، سه تکرار در نظر گرفته شد. پتری‌ها به‌مدت سه روز در ژرمیناتور در دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند و طی سه مرحله در روز، تعداد بذره‌های جوانه‌زده شمارش شد. داده‌های حاصل با نرم‌افزار جرمین آنالیز و درصد جوانه‌زنی محاسبه شد. درصد گیاهچه‌های نرمال با شمارش و طول گیاهچه‌ها با خط‌کش اندازه‌گیری شد. بنیه گیاهچه نیز با رابطه زیر محاسبه شد:

$$SV = \frac{NS \times SL}{100} \quad (1)$$

در این رابطه، SV بنیه گیاهچه، NS درصد گیاهچه‌های نرمال و SL طول گیاهچه است.

به‌منظور ارزیابی صفات مرفولوژیک، بیوشیمیایی و بیان ژن‌ها، بذره‌های جوانه‌دار یکنواخت (بذرهایی که تحت تنش قرار نگرفته بودند) در تشتک‌های ویژه آبکشت با محلول هوگلند نشا شدند. بعد از رسیدن گیاهچه‌ها به مرحله ۳-۴ برگ، تنش کلرید جیوه در غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵ میکرومولار اعمال و از محلول هوگلند کامل نیز به‌عنوان تیمار شاهد استفاده شد. کلرید جیوه به‌عنوان فاکتور اصلی و ژنوتیپ‌ها به‌عنوان فاکتور فرعی در نظر گرفته شدند. گیاهچه‌ها به‌مدت ۱۰ روز در شرایط تیمار کلرید جیوه قرار گرفتند و بعد از آن، نمونه‌های گیاهی به‌منظور اندازه‌گیری صفات مرفولوژیک از محیط آب‌کشت خارج و روی کاغذ صافی قرار داده شدند. بعد از خشک شدن آب اضافی روی ریشه‌ها، طول ریشه و ساقه اندازه‌گیری شد. به‌منظور ارزیابی صفات بیوشیمیایی و بیان ژن‌ها، نمونه‌های برگ‌ی بلافاصله به فریزر ۸۰- منتقل شدند. برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز و پراکسیداز از روش میشر و همکاران (Mishra et al., 2009) استفاده شد. جهت ارزیابی فعالیت آنزیم پراکسیداز، ابتدا محلول‌های تریس یک مولار، آب اکسیژنه ۵۰ میلی‌مولار و پیروگالل ۱۰۰ میلی‌مولار تهیه و سپس ده میلی‌لیتر از این محلول‌ها، با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شدند و سپس ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول نهایی با ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در این آزمایش

Table 1. Characteristics of the primers used in this experiment

| Primer name       | Primer sequence             | Melting Temperature (C°) | NCBI accession number |
|-------------------|-----------------------------|--------------------------|-----------------------|
| <i>SOD</i> For,   | 5'-CCGGACTACCTGACCAACAT-3'  | 59.48                    | AF092524              |
| <i>SOD</i> Rev,   | 5'-AAGGTCCCGACAGTGGGAATA-3' |                          |                       |
| <i>POX</i> For,   | 5'-AATCAGACCGTCTCCTGCG-3'   | 60                       | CAA39486              |
| <i>POX</i> Rev,   | 5'-GGTGGTGTCTGTTGTTGAAC-3'  |                          |                       |
| <i>GAPDH</i> For, | 5'-TCACCACCGACTACATGACC-3'  | 60                       | EF 592180             |
| <i>GAPDH</i> Rev, | 5'-ACAGCAACCTCCTTCTCACC-3'  |                          |                       |

## نتایج و بحث

احتمال یک درصد و برهمکنش کلرید جیوه در ژنوتیپ نیز برای فعالیت آنزیم‌های پلی فنل اکسیداز و پراکسیداز در سطح احتمال یک درصد و برای فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در سطح احتمال پنج درصد معنی دار شد.

نتایج مقایسه میانگین برهمکنش کلرید جیوه در ژنوتیپ از نظر درصد جوانه‌زنی (شکل ۱) نشان داد که با افزایش سطح تنش کلرید جیوه، درصد جوانه‌زنی در ژنوتیپ‌های مختلف گندم کاهش یافت. بیشترین مقدار جوانه‌زنی در رقم گنبد و در تیمار شاهد (۱۰۰ درصد) مشاهده شد که اختلاف آن با سایر تیمارها معنی دار بود. کمترین مقدار جوانه‌زنی را نیز رقم مروارید با ۸۹ درصد جوانه‌زنی داشت. در شرایط تنش نیز رقم گنبد در تمامی تیمارها درصد جوانه‌زنی بالاتری داشت و اختلاف آن با دو ژنوتیپ دیگر در سطح احتمال پنج درصد معنی دار بود. رقم مروارید تحت تنش کلرید جیوه به جز در تیمار کاربرد ۱۰ میکرومولار کلرید جیوه، درصد جوانه‌زنی کمتری نسبت به لاین N9108 داشت، ولی اختلاف این دو ژنوتیپ در شرایط تنش معنی دار نبود.

نتایج تجزیه واریانس آزمایش برای شاخص‌های جوانه‌زنی و صفات مرفولوژیک در جدول ۲ و برای صفات بیوشیمیایی در جدول ۳ ارائه شده است. نتایج تجزیه واریانس شاخص‌های جوانه‌زنی و صفات مرفولوژیک (جدول ۲) نشان داد که اثر تیمار کلرید جیوه، به جز صفات درصد جوانه‌زنی و درصد گیاهچه نرمال که در سطح احتمال پنج درصد معنی دار بود، برای سایر صفات مورد مطالعه در سطح احتمال یک درصد معنی دار شد. اثر ژنوتیپ نیز برای تمامی صفات مطالعه شده در سطح احتمال یک درصد معنی دار شد. برهمکنش ژنوتیپ در کلرید جیوه برای تمامی صفات، به غیر از طول ریشه، معنی دار بود. نتایج تجزیه واریانس صفات بیوشیمیایی (جدول ۳) نشان داد که اثر تنش کلرید جیوه برای فعالیت آنزیم‌های پلی فنل اکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در سطح احتمال یک درصد و برای آنزیم پراکسیداز در سطح احتمال پنج درصد معنی دار شد. اثر ژنوتیپ برای فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در سطح احتمال پنج درصد و برای دو صفت دیگر در سطح

جدول ۲- تجزیه واریانس ویژگی‌های جوانه‌زنی و مورفولوژیک در ژنوتیپ‌های گندم مورد مطالعه

Table 2. Analysis of variance of the germination and morphological traits in the studied wheat genotypes

| Source of variations        | df | Mean squares           |                            |                 |                |                    |             |
|-----------------------------|----|------------------------|----------------------------|-----------------|----------------|--------------------|-------------|
|                             |    | Germination percentage | Normal seedling percentage | Seedling length | Seedling vigor | Root length        | Stem length |
| Mercury chloride            | 3  | 126*                   | 12.1*                      | 82.1**          | 8.9**          | 45.5**             | 142.1**     |
| Error 1                     | 8  | 28.6                   | 2.28                       | 2.98            | 1.13           | 0.67               | 0.948       |
| Genotype                    | 2  | 85.6**                 | 105**                      | 45.7**          | 25.6**         | 25.6**             | 35.27**     |
| Mercury chloride × Genotype | 6  | 29.1*                  | 9.37**                     | 6.77*           | 7.17**         | 0.17 <sup>ns</sup> | 3.377**     |
| Error 2                     | 16 | 7.8                    | 1.145                      | 1.145           | 0.94           | 0.44               | 0.145       |
| CV%                         | -  | 6.3                    | 3.9                        | 2.8             | 4.1            | 3.4                | 1.4         |

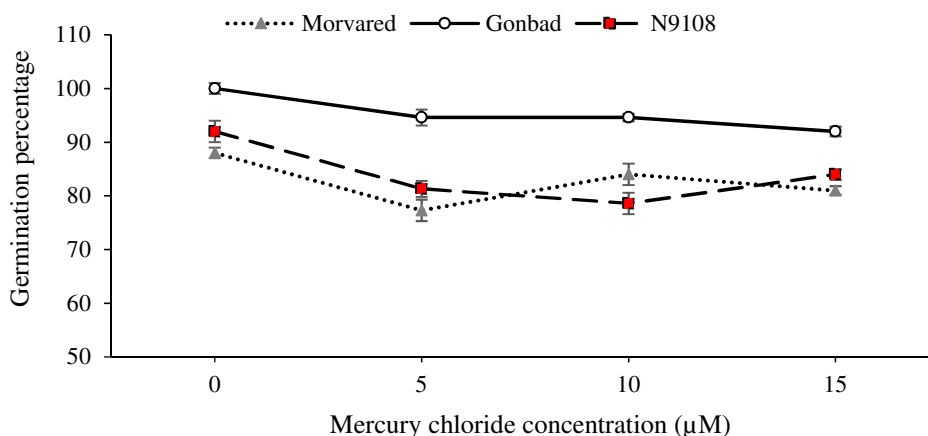
<sup>ns</sup>, \* and \*\*: Not-significant and significant at 5% and 1% probability levels, respectively.

جدول ۳- تجزیه واریانس صفات بیوشیمیایی در ژنوتیپ‌های گندم مورد مطالعه

Table 3. Analysis of variance of the biochemical traits in the studied wheat genotypes

| Source of variations        | df | Mean squares       |            |                      |
|-----------------------------|----|--------------------|------------|----------------------|
|                             |    | Polyphenol oxidase | Peroxidase | Superoxide dismutase |
| Mercury chloride            | 3  | 9.85**             | 6.15*      | 15.5**               |
| Error 1                     | 8  | 1.18               | 1.10       | 2.07                 |
| Genotype                    | 2  | 10.14*             | 11.7**     | 25.6**               |
| Mercury chloride × Genotype | 6  | 13.7*              | 5.37*      | 10.1**               |
| Error 2                     | 16 | 2.45               | 0.945      | 1.44                 |
| CV%                         | -  | 2.9                | 3.1        | 5.9                  |

\* and \*\*: Significant at 5% and 1% probability levels, respectively.



شکل ۱- تغییرات درصد جوانه‌زنی ژنوتیپ‌های گندم در غلظت‌های مختلف کلرید جیوه

Figure 1. Changes in germination percentage of wheat genotypes at different concentrations of mercury chloride

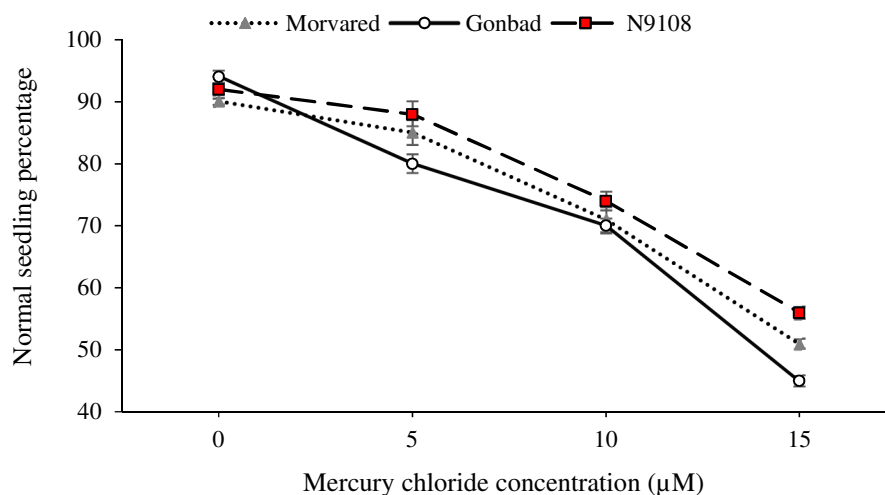
دیگری، اثر مقادیر مختلف کلرید جیوه بر درصد جوانه‌زنی بذر واریته‌های مختلف گندم بررسی و مشخص شد که درصد جوانه‌زنی بذرها با افزایش غلظت کلرید جیوه کاهش یافت و کم‌ترین درصد جوانه‌زنی در غلظت ۳۰۰ پی.پی.ام مشاهده شد، ولی شرایط در واریته‌های مختلف و در زمان‌های مختلفی که بذرها تحت تیمار کلرید جیوه قرار گرفتند، متفاوت بود (Saraswat et al., 2018).

تغییرات درصد گیاهچه‌های طبیعی ژنوتیپ‌های گندم مورد مطالعه در غلظت‌های مختلف کلرید جیوه در شکل ۲ ارائه شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، درصد گیاهچه طبیعی در هر سه ژنوتیپ با افزایش سطح تنش کاهش یافت. کم‌ترین گیاهچه طبیعی را رقم گنبد با ۴۲ درصد تحت تنش ۱۵ میکرومولار کلرید جیوه داشت که اختلاف معنی‌داری در

فلزات سنگین با مهار هیدرولیز نشاسته آندوسپرم از سرعت جوانه‌زنی و رشد اولیه بذر جلوگیری و برخی دیگر با آسیب رساندن به رویان از جوانه‌زنی دانه جلوگیری می‌کنند (Saraswat, 2017). به‌طور کلی، فلزات از دو طریق، سمیت کلی بذرها و جذب آب، جوانه‌زنی را تحت تاثیر قرار می‌دهند و با توجه به غلظت خود قادر به کاهش جوانه‌زنی هستند (Kranmer and Colville, 2011). گزارش شده است که جیوه، مس، روی، سرب، کبالت و کادمیوم، بیش‌ترین تاثیر بازدارندگی را بر جوانه‌زنی و رشد گندم و خیار نسبت به سایر فلزات داشتند (Munzuroglu and Geckil, 2002). در آزمایشی، تیمار بذر گندم با فلز مس با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر و بالاتر، موجب کاهش درصد جوانه‌زنی بذر شد (Hoshmadfar and Moraghebi, 2011). در آزمایش

ارقامی که توانایی بیش‌تری برای مصرف سریع‌تر مواد غذایی دارند، توانایی تحمل به شرایط تنش نیز در آن‌ها بیشتر است و این ارقام مواد بیش‌تری از ذخایر بذری را تحت شرایط تنش مصرف می‌کنند و در نتیجه طول و وزن گیاهچه و به‌دنبال آن بنیه گیاهچه افزایش می‌یابد و در پی آن به‌دلیل انتقال بیش‌تر و سریع‌تر مواد به محور ریشه‌چه، خروج ریشه‌چه با سرعت بیش‌تری اتفاق می‌افتد و بنابراین سرعت جوانه‌زنی افزایش می‌یابد (Soltani *et al.*, 2006). در مطالعه‌ای روی جوانه‌زنی و رشد آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana* L.) گزارش شد که فلزات سنگین سمیت متفاوتی در مراحل مختلف فیزیولوژیک بذر داشتند و رشد گیاهچه نسبت به جوانه‌زنی، حساسیت بیش‌تری به فلزاتی مثل روی، جیوه، سرب و مس داشت (Li *et al.*, 2007).

سطح احتمال پنج درصد با دو ژنوتیپ دیگر داشت. لاین N9108 نیز با ۸۸، ۷۴ و ۵۶ درصد گیاهچه طبیعی به‌ترتیب تحت شرایط کاربرد ۵، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار کلرید جیوه، بیش‌ترین درصد گیاهچه طبیعی را تولید کرد که اختلاف آن با رقم مروارید در سطوح تنش ۵ و ۱۰ میکرومولار کلرید جیوه معنی‌دار نبود، اما در سطح ۱۵ میکرومولار کلرید جیوه اختلاف معنی‌داری نشان داد. تفاوت بین درصد جوانه‌زنی ارقام و درصد گیاهچه نرمال نشان داد که شاید سمیت کلرید جیوه مانع از جوانه‌زنی بذرها نشود، بلکه با تأثیر بر فعالیت‌های بیوشیمیایی باعث ایجاد گیاهچه‌های غیرطبیعی می‌شود که قادر به تولید عملکرد نیستند. تفاوت بین ارقام از لحاظ شاخص‌های جوانه‌زنی از قبیل طول گیاهچه، وزن خشک گیاهچه، درصد گیاهچه طبیعی و بنیه گیاهچه را می‌توان به تفاوت در مصرف مواد ذخیره‌ای بذر ارتباط داد، به‌طوری‌که



شکل ۲- تغییرات درصد گیاهچه طبیعی ژنوتیپ‌های گندم در غلظت‌های مختلف کلرید جیوه

Figure 2. Changes in normal seedling percentage of wheat genotypes at different concentrations of mercury chloride

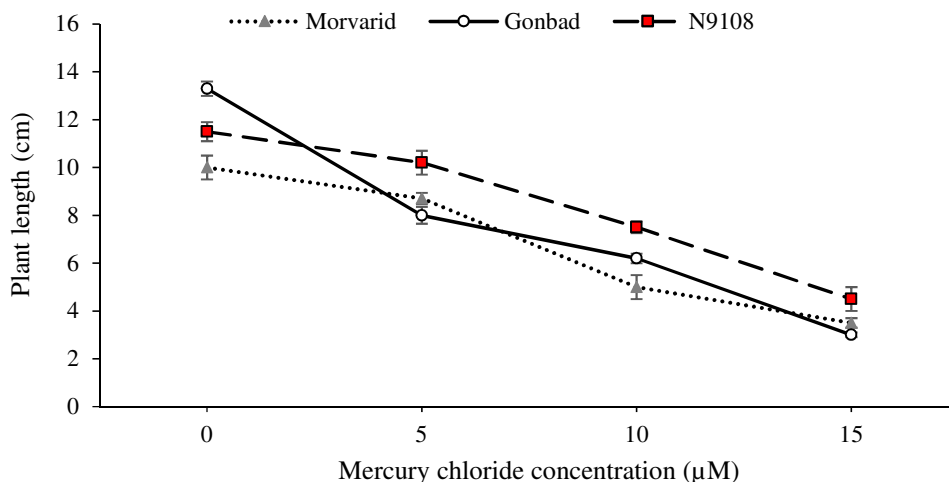
رقم گنبد مشاهده شد که اختلاف آن با رقم مروارید معنی‌دار نبود، ولی اختلاف هر دو رقم با لاین N9108 در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار شد. همچنین، لاین N9108 در تیمارهای ۵ و ۱۰ میکرومولار کلرید جیوه به‌ترتیب با ۱۰/۲ و ۷/۵ سانتی‌متر، طول گیاهچه بیش‌تری داشت و اختلاف آن با دو رقم دیگر در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود. وجود فلزات سنگین در محیط جوانه‌زنی، به‌دلیل نفوذ سریع به‌داخل

مقایسه میانگین برهمکنش کلرید جیوه در ژنوتیپ برای طول گیاهچه (شکل ۳) نشان داد که بیش‌ترین طول گیاهچه را رقم گنبد با ۱۳/۳ سانتی‌متر در تیمار شاهد داشت که اختلاف آن با دو ژنوتیپ دیگر در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود. با افزایش سطح تنش کلرید جیوه، طول گیاهچه در هر سه ژنوتیپ کاهش یافت و کم‌ترین طول گیاهچه (۳ سانتی‌متر) در شرایط کاربرد ۱۵ میکرومولار کلرید جیوه در

مقابل، اختلاف هر دو رقم با لاین N9108 در سطح احتمال ۵ درصد معنی دار بود. بیش‌ترین بنیه گیاهچه را رقم گنبد (۱۲/۵۰ واحد) در تیمار شاهد داشت که اختلاف آن با دو ژنوتیپ دیگر با آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد معنی دار بود، اما تحت غلظت‌های مختلف کلرید جیوه، لاین N9108 بنیه گیاهچه بیش‌تری نسبت به دو رقم دیگر داشت که اختلاف بین آن‌ها در سطح احتمال پنج درصد معنی دار بود. بیش‌ترین بنیه گیاهچه برای این ژنوتیپ ۸/۹۷ واحد بود که تحت تنش ۵ میکرومولار کلرید جیوه به‌دست آمد (شکل ۴). شاخص بنیه بذر و انرژی لازم برای جوانه‌زنی، معیارهایی برای ارزیابی قدرت بذر هستند و بالاتر بودن مقادیر آن‌ها، نشان‌دهنده توانمندی بیش‌تر بذر برای جوانه‌زنی است (Abdul-Baki and Anderson, 1973). بنابراین، با توجه به این مطالب، به‌نظر می‌رسد که بذر لاین N9108 نسبت به دو ژنوتیپ دیگر، از توانایی بیش‌تری برای جوانه‌زنی تحت شرایط تنش کلرید جیوه برخوردار بود. همانند آزمایش حاضر، در آزمایش‌های دیگری نیز نشان داده شده است که تنش فلزات سنگین سبب کاهش شاخص‌های مثبت جوانه‌زنی در گیاهان مختلف می‌شود (Tavili *et al.*, 2013; Ramezani *et al.*, 2014).

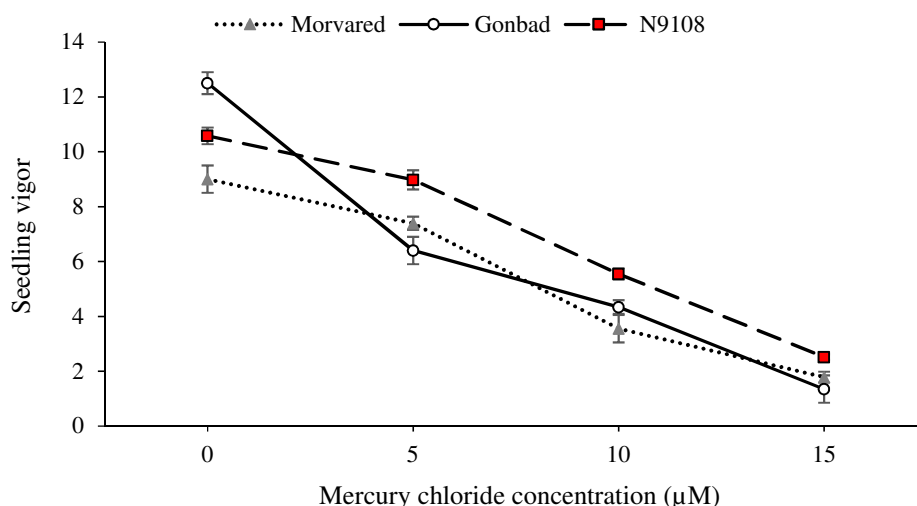
بذر همراه با آب، با تأثیر بر فرآیندهای فیزیولوژیک مهم از جمله تنفس و ممانعت از تقسیم سلول‌ها، سبب اختلال در رشد گیاهچه می‌شوند (Marquez-Garcia *et al.*, 2013). این فلزات با تحت تأثیر قرار دادن آنزیم‌های هیدرولایزیک مانند آمیلاز که نشاسته را تبدیل به قند می‌کند، موجب می‌شوند مواد غذایی به ریشه‌چه و ساقه‌چه نرسد و در نهایت طول رشد گیاهچه محدود می‌شود (Xiong, 1998). فلزات سنگین با کاهش گسترش سلولی در ناحیه طویل‌شدن و یا مهار تقسیم سلولی و یا هر دو فرایند، سبب کاهش طول ریشه می‌شوند (Nalini and Chandra, 2002). پرالتا و همکاران (Peralta *et al.*, 2001) نشان دادند که با افزایش غلظت فلز کادمیوم در محیط کشت یونجه رقم مالون، طول ریشه‌چه و ساقه‌چه، جوانه‌زنی بذر و نهایتاً طول گیاهچه کاهش یافت. کاهش طول گیاهچه تحت تیمار ۴ میلی‌گرم کادمیوم در لوبیا نیز گزارش شده است (Shafiq *et al.*, 2008).

مقایسه میانگین برهمکنش کلرید جیوه در ژنوتیپ برای صفت بنیه گیاهچه در شکل ۴ ارائه شده است. نتایج نشان داد که با افزایش سطح کلرید جیوه، بنیه گیاهچه کاهش یافت و این کاهش برای رقم گنبد با بنیه ۱/۳۵ در تنش ۱۵ میکرومولار کلرید جیوه کم‌تر از دو ژنوتیپ دیگر بود، اما اختلاف آن با رقم مروارید در همین شرایط معنی دار نشد. در



شکل ۳- تغییرات طول گیاهچه ژنوتیپ‌های گندم در غلظت‌های مختلف کلرید جیوه

Figure 3. Changes in seedling length of wheat genotypes at different concentrations of mercury chloride



شکل ۴- تغییرات بنیه گیاهچه ژنوتیپ‌های گندم در غلظت‌های مختلف کلرید جیوه

Figure 4. Changes in seedling vigor of wheat genotypes at different concentrations of mercury chloride

غلظت جیوه، کاهش معنی‌داری بر سطح ریشه و رشد گندم داشت (Munzuroglu and Geckil, 2002). حساسیت سیستم ریشه‌ای به فلزات سنگین بیش‌تر از ساقه و برگ است (YU Da, 2002). از آنجایی که ریشه‌های گیاهان اولین نقطه تماس با فاکتورهای سمی مانند فلزات هستند، بنابراین کاهش طول ریشه در گیاهان در مقایسه با رشد شاخساره‌ها، زمانی که در معرض تیمارهای مختلف تنش مانند سرب و کادمیوم قرار می‌گیرند، چشم‌گیر است (Kabir *et al.*, 2008). در بررسی اثر سمیت مس بر لوبیا چشم بلبلی، مشاهده شد که رشد ریشه‌ها در غلظت‌های بالای مس کاهش یافت. کاهش طول ریشه گندم در حضور فلزات مس و کادمیوم (Gajewska and Skłodowska, 2010) و کاهش طول ریشه لوبیا در حضور کادمیوم (Howladar, 2014) نیز گزارش شده است.

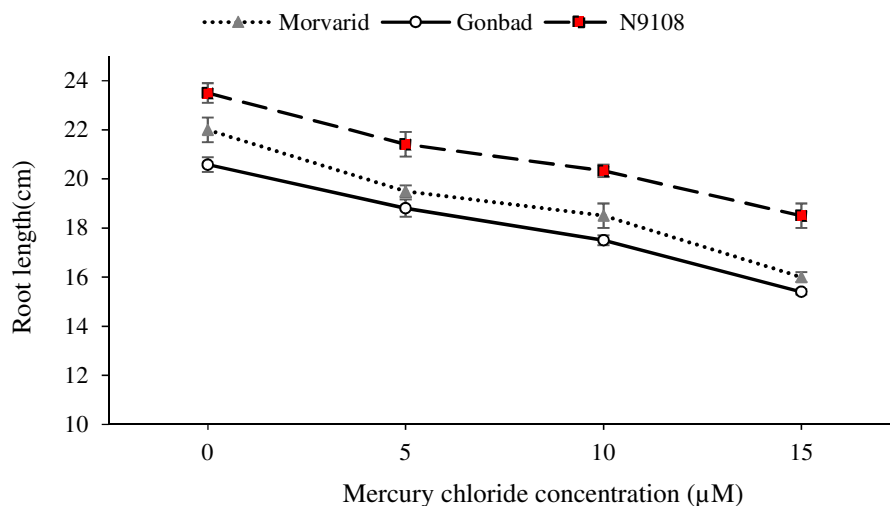
مقایسه میانگین برهمکنش کلرید جیوه در ژنوتیپ (شکل ۶) نشان داد که لاین N9108 و رقم گنبد در تیمار شاهد به‌ترتیب با طول ساقه ۳۲/۵ و ۳۲/۸۷ سانتی‌متر بیش‌ترین طول ساقه را داشتند و اختلاف آن‌ها با طول ساقه رقم مروارید در شرایط مشابه در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود. کم‌ترین طول ساقه در تمامی ژنوتیپ‌ها نیز در تیمار کاربرد ۱۵ میکرومولار کلرید جیوه مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها داشت. تفاوت بین ژنوتیپ‌ها نیز در

نتایج مقایسه میانگین برهمکنش کلرید جیوه و ژنوتیپ (شکل ۵) نشان داد که لاین N9108 با طول ریشه ۲۳/۵ سانتی‌متر در تیمار شاهد، بیش‌ترین طول ریشه را داشت و اختلاف آن با سایر تیمارها در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود. با افزایش میزان کاربرد کلرید جیوه، طول ریشه در هر سه ژنوتیپ کاهش یافت و کم‌ترین طول ریشه در رقم گنبد در شرایط کاربرد ۱۵ میکرومولار کلرید جیوه (۱۵/۴ سانتی‌متر) مشاهده شد، ولی اختلاف آن با رقم مروارید (۱۶ سانتی‌متر) در شرایط مشابه معنی‌دار نبود. نتایج این مطالعه با نتایج ساهو و همکاران (Sahu *et al.*, 2012) مبنی بر کاهش طول ریشه با افزایش غلظت جیوه مطابقت داشت. ژوو و همکاران (Zhou *et al.*, 2008) نیز گزارش کردند که سمیت جیوه در اثر افزایش غلظت این عنصر به محیط رشد گیاه موجب توقف رشد ریشه شد. جیوه باعث کاهش محتوای کلروفیل و پروتئین‌های محلول و به‌دنبال آن، رشد ریشه و ساقه در گندم می‌شود. جمال و همکاران (Jamal *et al.*, 2006) گزارش کردند که اثر غلظت‌های بالاتر جیوه بر کاهش رشد ریشه بیش‌تر از ساقه بود. این محققین گزارش کردند که غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۷۵ پی.پی.ام کلرید جیوه، ضمن کاهش میزان کلسیم و منیزیم برگ گیاهان، موجب کاهش طول ساقه و ریشه و میزان جوانه‌زنی در دو ژنوتیپ گندم شدند. در آزمایش دیگری نیز گزارش شد که افزایش



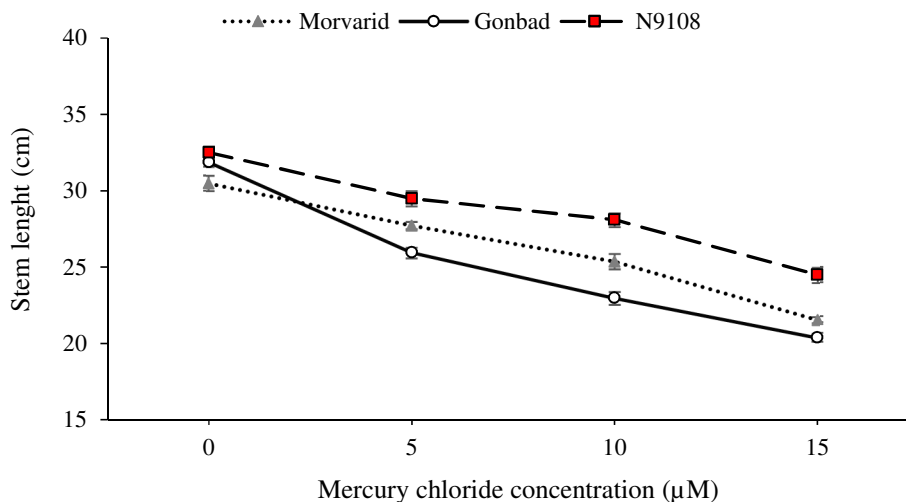
این تیمار معنی‌دار بود، به طوری که لاین N9108 و رقم گنبد به ترتیب با طول ساقه ۲۴/۵ و ۲۰/۴ سانتی‌متر، بیش‌ترین و کم‌ترین طول ساقه را داشتند. در همین راستا، ساهاو و همکاران (Sahu *et al.*, 2012) و ساراسوات و همکاران (Saraswat *et al.*, 2018) نیز گزارش کردند که افزایش غلظت جیوه موجب کاهش طول ساقه گندم شد. کاهش ارتفاع بوته با کاربرد غلظت بالای کادمیوم در نخود (Faiazan

و یوسفی *et al.*, 2018). کاهش می‌یابد (Yousefi *et al.*, 2018). نشان می‌دهند که این فلز با تاثیر بر تقسیم سلولی و تنظیم رشد و نمو منطقه مریستمی گیاهان، موجب کاهش تعداد گره‌ها و فاصله بین آن‌ها می‌شود و در پی آن ارتفاع گیاه کاهش می‌یابد (Yousefi *et al.*, 2018).



شکل ۵- تغییرات طول ریشه ژنوتیپ‌های گندم در غلظت‌های مختلف کلرید جیوه

Figure 5. Changes in root length of wheat genotypes at different concentrations of mercury chloride



شکل ۶- تغییرات طول ساقه ژنوتیپ‌های گندم در غلظت‌های مختلف کلرید جیوه

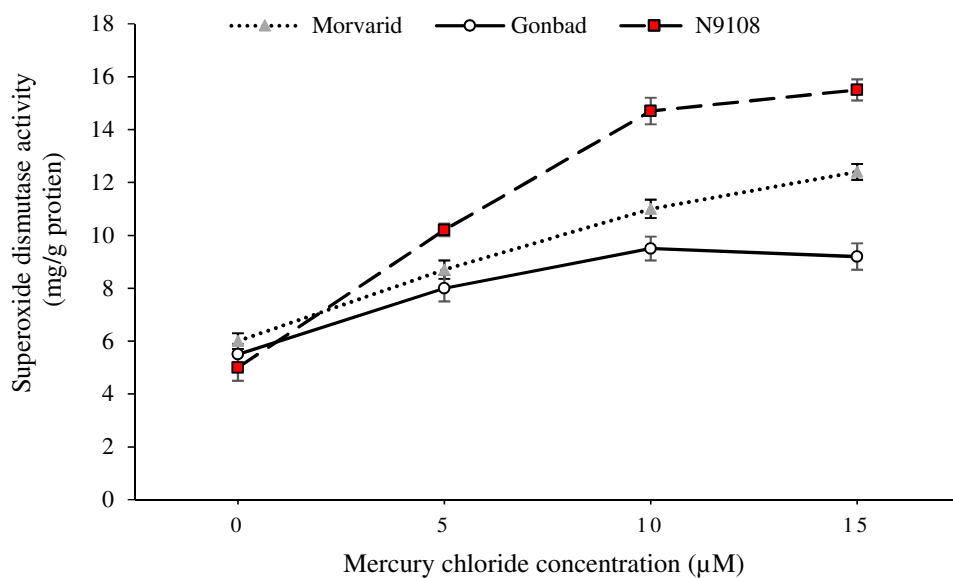
Figure 6. Changes in stem length of wheat genotypes at different concentrations of mercury chloride

سطح تنش می‌تواند به دلیل سمیت بالا و آسیب جدی اندامک‌های سلولی و اختلال در فرآیند تولید این آنزیم باشد. پراکسیدها از جمله آنزیم‌هایی هستند که نقش بسیار مهمی در پاسخ به انواع تنش‌ها دارند. از جمله پروتئین‌های القا شده در طول دفاع گیاه میزبان در برابر تنش، تولید پراکسیداز است که مسئول حذف مقادیر اضافی پراکسید هیدروژن می‌باشد (Almagro *et al.*, 2009). تنش اکسیداتیو حاصل از جیوه، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نظیر سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز را به دنبال دارد و تولید آن‌ها نشان‌دهنده میزان تنش اکسیداتیو است (Zhou *et al.*, 2007). با افزایش فعالیت این آنزیم، گیاه کم‌تر مورد تهاجم گونه‌های فعال اکسیژن قرار می‌گیرد، زیرا آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز، اصلی‌ترین آنزیم‌های از بین برنده  $H_2O_2$  در گیاهان هستند (Tewari *et al.*, 2005).

مقایسه میانگین برهمکنش کلرید جیوه و ژنوتیپ برای میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در شکل ۹ ارائه شده است. نتایج نشان داد که میزان فعالیت این آنزیم در ژنوتیپ‌ها در شرایط تیماری مختلف متفاوت بود، به طوری که بیش‌ترین میزان فعالیت این آنزیم را رقم گنبد در تیمار شاهد (عدم کاربرد کلرید جیوه) داشت که اختلاف آن با دو ژنوتیپ دیگر با آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود، اما با افزایش سطح تنش، بیش‌ترین کاهش فعالیت این آنزیم در ژنوتیپ گنبد مشاهده شد. در لاین N9108 میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در شرایط کاربرد کلرید جیوه (تنش) بیش‌تر از دو رقم دیگر بود، به طوری که بیش‌ترین مقدار فعالیت آنزیم هم در این ژنوتیپ با ۳۵/۴ میلی‌گرم بر گرم پروتئین در سطح تنش ۵ میکرومولار به دست آمد که اختلاف آن با دو رقم دیگر در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود، ولی تفاوت معنی‌داری با میزان فعالیت این آنزیم در شرایط کاربرد ۱۰ میکرومولار کلرید جیوه (۳۳/۹ میلی‌گرم بر گرم پروتئین) نداشت. کاهش فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در غلظت‌های بالا می‌تواند به دلیل غیرفعال شدن آنزیم توسط گونه‌های فعال اکسیژن، کاهش سنتز آنزیم و یا تغییر در اجتماع زیرواحدهای آنزیم باشد. از طرف دیگر، فعال‌شدن پروتئین‌های پراکسیزومی، ممکن است دلیل دیگری برای کاهش فعالیت این آنزیم باشد (Mishra *et al.*, 2006).

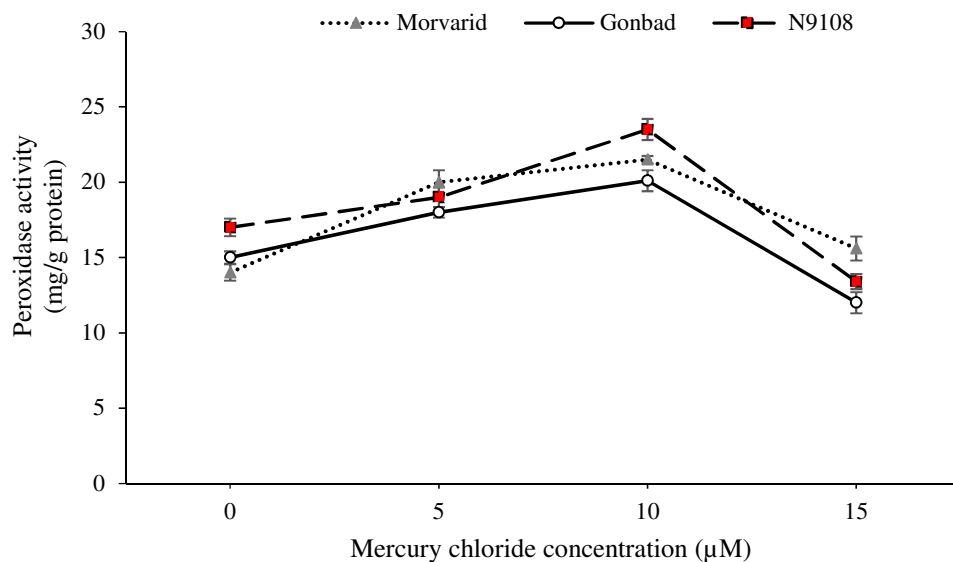
مقایسه میانگین برهمکنش کلرید جیوه و ژنوتیپ بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (شکل ۷) نشان داد که فعالیت این آنزیم با افزایش مقدار کلرید جیوه افزایش یافت و بیش‌ترین فعالیت آن در تیمار ۱۵ میکرومولار کلرید جیوه مشاهده شد. فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در لاین N9108 با ۱۴/۷ و ۱۵/۵ میکروگرم بر گرم به ترتیب تحت تیمار ۱۰ و ۱۵ میکرومولار کلرید جیوه، نسبت به دو رقم دیگر بیش‌تر بود و اختلاف معنی‌داری با آن‌ها در سطح احتمال پنج درصد نشان داد. کم‌ترین فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نیز در هر سه ژنوتیپ تحت شرایط بدون تنش مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها در سطح احتمال پنج درصد وجود نداشت. سوپراکسید دیسموتاز در بسیاری از اندامک‌های سلولی به عنوان اولین سیستم دفاع در برابر گونه‌های فعال اکسیژن محسوب می‌شود، زیرا بر رادیکال‌های آزاد سوپراکسید که در بخش‌های مختلف سلول و پیش‌ماده‌های دیگر گونه‌های فعال اکسیژن هستند، عمل می‌کند. معمولاً رادیکال سوپراکسید اولین رادیکال آزادی است که طی تنش تولید می‌شود و سوپراکسید دیسموتاز سریعاً رادیکال‌های سوپراکسید را به پراکسید هیدروژن و اکسیژن معمولی تبدیل و با حذف سوپراکسید نقش حیاتی‌تری نسبت به آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در سیستم آنتی‌اکسیدانی ایفا می‌کند و سبب افزایش مقاومت گیاهان در برابر تنش‌های محیطی می‌شود (Shi *et al.*, 2007; Gill and Tuteja, 2010).

تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز در سطوح مختلف کلرید جیوه در سه ژنوتیپ مورد مطالعه در شکل ۸ ارائه شده است. نتایج نشان داد که در شرایط کاربرد ۵ و ۱۰ میکرومولار کلرید جیوه، میزان فعالیت این آنزیم افزایش یافت، ولی فعالیت آن در هر سه ژنوتیپ در سطح تنش ۱۵ میکرومولار کاهش یافت و اختلاف معنی‌داری با دو سطح دیگر در سطح احتمال پنج درصد داشت. بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (۲۳/۵ میلی‌گرم بر گرم پروتئین) در لاین N9108 در سطح تنش ۱۰ میکرومولار مشاهده شد که اختلاف آن با دو رقم دیگر در همین سطح کلرید جیوه در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود. کم‌ترین میزان فعالیت آنزیم نیز با ۱۲ میلی‌گرم بر گرم پروتئین در رقم گنبد در سطح تنش ۱۵ میکرومولار به دست آمد که اختلاف معنی‌داری با دو ژنوتیپ دیگر در سطح احتمال پنج درصد داشت. کاهش مقدار این آنزیم در بالاترین



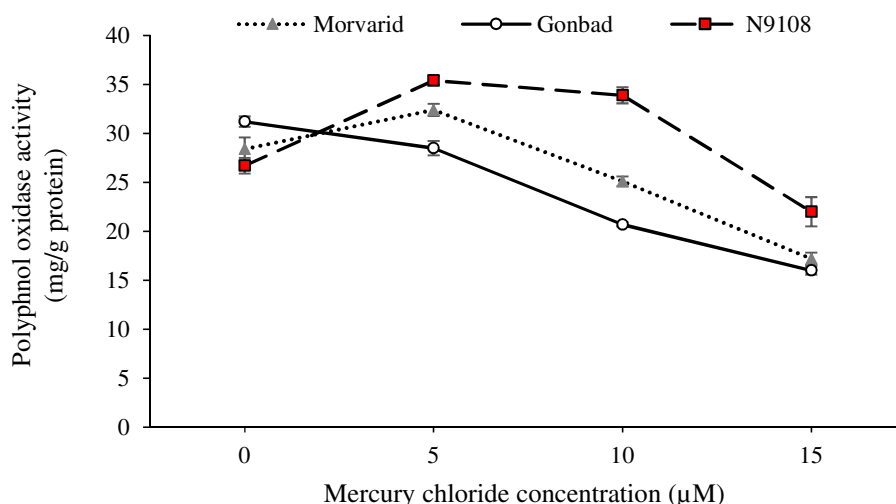
شکل ۷- تغییرات فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز ژنوتیپ‌های گندم در غلظت‌های مختلف کلرید جیوه

Figure 7. Changes in superoxide dismutase activity of wheat genotypes at different concentrations of mercury chloride



شکل ۸- تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز ژنوتیپ‌های گندم در غلظت‌های مختلف کلرید جیوه

Figure 8. Changes in peroxidase enzyme activity of wheat genotypes at different concentrations of mercury chloride



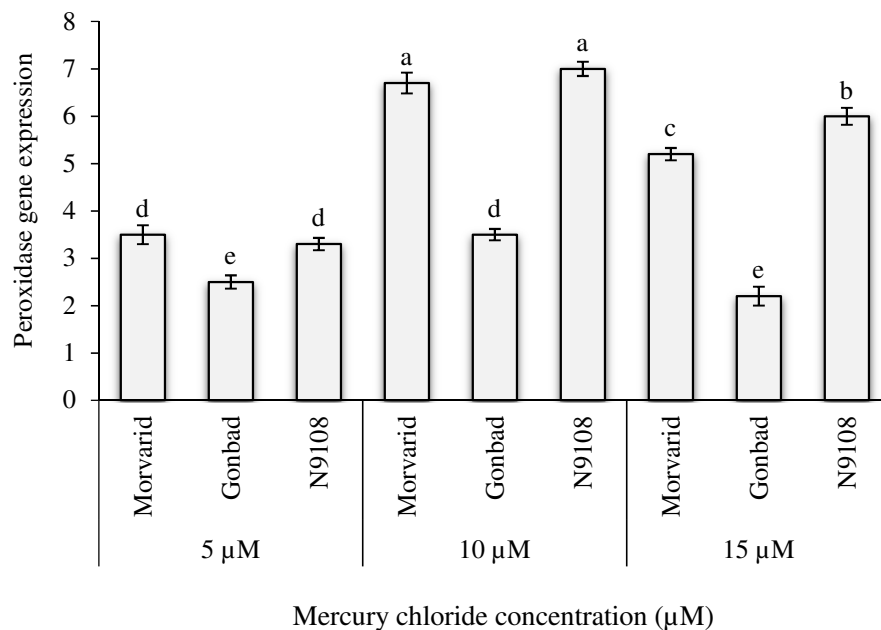
شکل ۹- تغییرات فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز ژنوتیپ‌های گندم در غلظت‌های مختلف کلرید جیوه

Figure 9. Changes in polyphenol oxidase activity of wheat genotypes at different concentrations of mercury chloride

این ژن در این تحقیق با افزایش سطح تنش، می‌تواند دلیلی بر تعدیل  $H_2O_2$  تولیدشده ناشی از تنش باشد. افزایش میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز طی تنش کادمیوم توسط جان و همکاران (John *et al.*, 2008) در *Lemna polyrrhiz* و بارانده و همکاران (Barandeh *et al.*, 2014) در عدس نیز گزارش شده است.

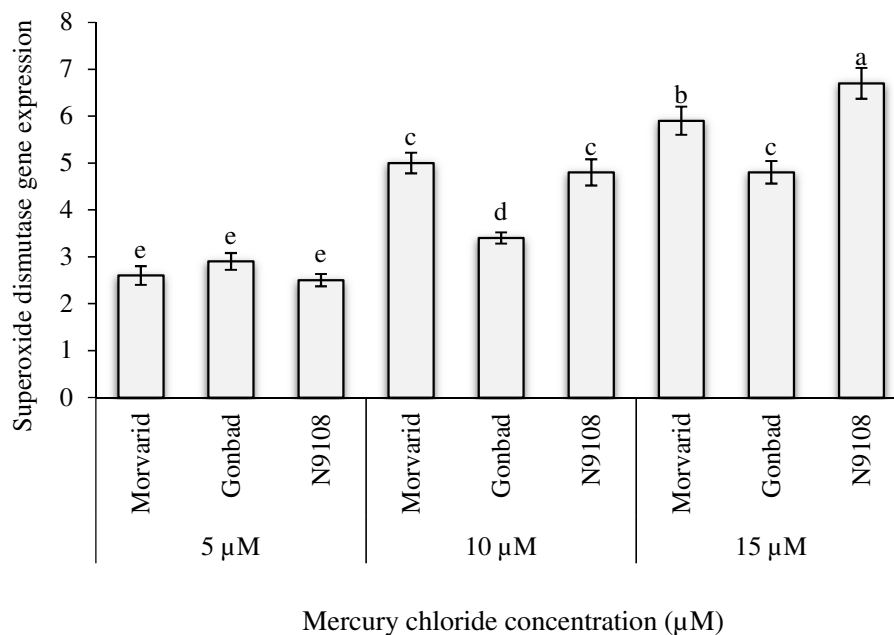
بررسی میزان بیان ژن سوپراکسید دیسموتاز (شکل ۱۱) نیز افزایش بیان این ژن را تحت تنش کلرید جیوه در هر سه ژنوتیپ نشان داد. کم‌ترین میزان بیان این ژن نسبت به شاهد در تیمار پنج میکرومولار کلرید جیوه در لاین N9108 مشاهده شد که تفاوت آن با دو رقم دیگر در همین شرایط تیماری معنی‌دار نبود. بیش‌ترین میزان بیان این ژن نیز در لاین N9108 تحت شرایط ۱۵ میکرومولار کلرید جیوه مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با دو رقم دیگر در سطح احتمال پنج درصد داشت. افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به دلیل مقابله با تنش اکسیداتیو و محافظت از سیستم دفاعی گیاه در برابر آسیب اکسیداتیو است (Malecka *et al.*, 2012). میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در بیش‌تر مطالعات انجام‌شده، متفاوت بوده است که می‌تواند به دلیل تفاوت در شرایط آزمایش مانند گونه گیاهی، نوع بافت، نوع فلز، غلظت فلز تیمار شده و مدت زمان تیمار باشد (Chin, 2007).

مقایسه بیان ژن پراکسیداز در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در سطوح مختلف کلرید جیوه در شکل ۱۰ ارایه شده است. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت کلرید جیوه از ۵ به ۱۰ میکرومولار، میزان بیان این ژن در هر سه ژنوتیپ افزایش یافت، ولی با افزایش مقدار کلرید جیوه به ۱۵ میکرومولار، مقدار بیان ژن کاهش یافت. بیش‌ترین مقدار بیان ژن نسبت به تیمار شاهد در لاین N9108 تحت تنش ۱۰ میکرومولار کلرید جیوه به دست آمد که اختلاف آن با شرایط مشابه در رقم مروارید در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود، ولی با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری نداشت. کم‌ترین میزان بیان ژن نیز با کاربرد ۱۵ میکرومولار کلرید جیوه در رقم گنبد مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با بیان این ژن در همین رقم تحت شرایط کاربرد ۵ میکرومولار کلرید جیوه نداشت. پراکسیدازها گروه بزرگی از آنزیم‌های دفاعی هستند که در گیاهان در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی تولید می‌شوند. پراکسیدازها معمولاً واکنش‌های احیا و اکسیداسیون را بین پراکسید هیدروژن به عنوان گیرنده الکترون و انواع زیادی از سوبستراها مثل اسید آسکوربیک، مواد فنلی، سیتوکروم C و آمین‌های آروماتیک کاتالیز و به عنوان آنزیم‌های سم‌زدای گونه‌های فعال اکسیژن عمل می‌کنند (Mittler, 2002). پراکسیداز پس از کاتالاز نقش مهمی در تعدیل  $H_2O_2$  تولیدشده طی تنش دارد (Cook *et al.*, 2004). افزایش بیان



شکل ۱۰- بیان نسبی ژن پراکسیداز در غلظت‌های مختلف کلرید جیوه

Figure 10. Relative expression of peroxidase gene at different concentrations of mercury chloride



شکل ۱۱- بیان نسبی ژن سوپر اکسید دیسموتاز در غلظت‌های مختلف کلرید جیوه

Figure 11. Relative expression of Superoxide dismutase gene at different concentrations of mercury chloride

## نتیجه گیری کلی

برتری داشت و می توان گفت این لاین تحمل بیش تری در برابر تنش فلز جیوه داشت. این آزمایش نشان داد که سمیت فلز سنگین جیوه منجر به فعالیت بیش تر برخی از آنزیم های کلیدی سیستم دفاع آنتی اکسیدانی و افزایش بیان ژن های پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در گندم می شود. برای مقاومت در برابر آسیب اکسیداتیو، آنزیم های آنتی اکسیدان موجود در گیاهان نقش مهمی ایفا می کنند و منجر به مقاومت نهایی گیاهان در شرایط تنش می شوند. نتایج تحقیق حاضر نیز نشان داد که میزان فعالیت آنزیم های سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز که در مکانیسم های دفاعی گیاه نقش دارند، به منظور مقابله با تنش کلرید جیوه نسبت به شرایط کنترل افزایش یافت. آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نقش مهمی در دفاع گیاه گندم در برابر تنش فلز جیوه دارد. همان طور که نتایج این تحقیق نیز نشان داد، میزان بیان ژن سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز در لاین N9108 بیش تر از دو رقم دیگر بود و این می تواند دلالت بر تحمل این لاین نسبت به دو رقم دیگر نسبت به تنش کلرید جیوه باشد.

در بین فلزات سنگین، جیوه به عنوان سمی ترین فلز در محیط زیست شناخته شده است. این فلز از مهم ترین آلاینده های محیطی است که سمیت آن به دلایل تغذیه ای، اکولوژیک، تکاملی و محیطی، مشکل بزرگی برای موجودات زنده و به ویژه برای انسان به وجود می آورد. جیوه با تجمع در دیواره سلولی و ورود به سیتوپلاسم، موجب تنش اکسیداتیو می شود و به دنبال آن، رادیکال های فعال اکسیژن در گیاهان تولید و باعث آسیب به ساختار لیپیدهای غشایی و متابولیسم سلولی می شود. گیاهان سازوکارهای مختلفی برای کاهش اثر مخرب رادیکال های آزاد اکسیژن دارند که از جمله این سازوکارها می توان به تولید ترکیبات آنزیمی و غیر آنزیمی اشاره کرد. نتایج این پژوهش نشان داد که با افزایش غلظت کلرید جیوه، شاخص های جوانه زنی و صفات مورفولوژی (طول ریشه و ساقه) کاهش یافت. لاین N9108 نسبت به دو ژنوتیپ دیگر در شرایط تنش کلرید جیوه از نظر طول ریشه و ساقه و بیش تر شاخص های جوانه زنی،

## References

- Abdul-Baki, A. A. and Anderson, J. D. 1973.** Vigor determination in soybean seed by multiple criteria. **Journal of Crop Science** 13: 630-633.
- Almagro, L., Gomez, L. V., Belchi-Navarro, S., Bru, R., Barcelo, A. and Pedreno, M. A. 2009.** Class III peroxidases in plant defense reactions. **Journal of Experimental Botany** 60 (2): 377-390.
- Amani, A. L. 2008.** Cadmium induced changes in pigment content, ion uptake, proline content and phosphoenol pyruvate carboxylase activity in *Triticum aestivum* seedlings. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences** 2 (1): 57-62.
- Barandeh, F., Kavousi, H. R. and Pourseyedi, Sh. 2014.** Activity of antioxidant enzymes, PAL and proline content of lentil seedlings under cadmium stress. Proceedings of the First Conference on New Finding in Environment and Agriculture Ecosystems. November 22, 2014, Tehran University, Tehran, Iran. (In Persian).
- Chin, L. 2007.** Investigations into lead (Pb) accumulation in *Symphytum officinale* L.: A phytoremediation study. Ph. D. Dissertation. University of Canterbury, New Zealand.
- Cook, D., Fowler, S. and Fiehn, O. 2004.** A prominent role for the CBF cold response pathway configuring the lowtemperature metabolome of *Arabidopsis*. **PNAS (Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America)** 101 (42): 15243-15248.
- Faizan, S., Kausar, S. and Perveen, R. 2011.** Varietal differences for cadmium-induced seedling mortality, foliar toxicity symptoms, plant growth, proline and nitrate reductase activity in chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Biology and Medicine** 3: 196-206.
- Gajewska, E. and Skłodowska, M. 2010.** Differential effect of equal copper, cadmium and nickel concentration on biochemical reactions in wheat seedlings. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 73: 996-1003.
- Ghiyasi, S., Karbassi, A., Moattar, F., Modabberi, S. and Sadough, M. B. 2010.** Origin and concentrations of heavy metals in agricultural land around aluminum industrial complex. **Journal of Food, Agriculture and Environment** 8 (3-4): 1237.
- Giannopolitis, C. S. and Ries, S. K. 1977.** Superoxide dismutases II. Purification and quantitative relationship with water-soluble protein in seedlings. **Plant Physiology** 59: 315-318.
- Gill, S. S. and Tuteja, N. 2010.** Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant physiology and Biochemistry** 48: 909-930.

- Houshmandfar, A. and Moraghebi, F. 2011.** Effect of mixed cadmium, copper, nickel and zinc on seed germination and seedling growth of safflower. **African Journal of Agricultural Research** 6 (5): 1182-1187.
- Howladar, S. M. 2014.** A novel *Moringa oleifera* leaf extract can mitigate the stress effects of salinity and cadmium in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 100: 69-75.
- Jamal, S. N., Iqbal, M. Z. and Athar, M. 2006.** Evaluation of two wheat varieties for phytotoxic effect of mercury on seed germination and seedling growth. **Agriculturae Conspectus Scientificus** 71 (2): 41-44.
- John, R., Ahmad, P., Gadgil, K. and Sharma, S. 2008.** Effect of cadmium and lead on growth, biochemical parameters and uptake in *Lemna polyrrhiza* L. **Plant, Soil and Environment** 54: 262-270.
- Kabir, M., Zafar Iqbal, M., Shafiq, M. and Farooqi, Z. R. 2008.** Reduction in germination and seedling growth of (*Thespesia populnea* L.) caused by lead and cadmium treatments. **Pakistani Journal of Botany** 40: 2419-2426.
- Kazemi, G., Navabpour, S. and Ramezani, S. S. 2010.** Evaluation of catalase gene expression and morphological traits in two wheat cultivar under salt stress. **Modern Genetic Journal** 1: 79-87. (In Persian with English Abstract).
- Kranner, I. and Colville, L. 2011.** Metals and seeds: Biochemical and molecular implications and their significance for seed germination. **Environmental and Experimental Botany** 72: 93-105.
- Li, W., Khan M. A., Yamaguchi, S. and Kamiya, Y. 2007.** Effects of heavy metals on seed germination and early seedling growth of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Growth Regulation** 46: 45-50.
- Malecka, A., Piechalak, A., Mensinger, A., Hanć, A., Baralkiewicz, D. and Tomaszewska, B. 2012.** Antioxidative defense system in *Pisum sativum* roots exposed to heavy metals (Pb, Cu, Cd, Zn). **Polish Journal of Environmental Studies** 21 (6): 1721-1730.
- Marquez-Garsia, B., Marquez, C., Sanjose, I., Nieva, F. J., Rodriguez Rubio, P. and Munoz-Rodriguez, A. F. 2013.** The effects of heavy metals on germination and seedling characteristics in two halophyte species in Mediterranean marshes. **Marine Pollution Bulletin** 70: 119-124
- Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R., Kumar, R., Seth, C. and Gupta, D. 2006.** Lead detoxification by coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) involves induction of phytochelatins and antioxidant system in response to its accumulation. **Chemosphere** 65: 1027-1039.
- Mishra, S., Tripathi, R. D., Dwivedi, S. and Trivedi, P. K. 2009.** Thiol metabolism play significant role during cadmium detoxification by *Ceratophyllum demersum* L. **Bioresource Technology** 100: 2155-2161.
- Mittler, R. 2002.** Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science** 7: 405-410.
- Moaveni, P. 2007.** 1200 important points in wheat. Samen Al-Hojaj Publishing, Tehran, Iran. (In Persian).
- Munzuroglu, O. and Geckil, H. 2002.** Effect of metals on seed germination root elongation and coleoptiles and hypocotyls growth in *Triticum aestivum* and *Cucumis salivus*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology** 43 (2): 203-213.
- Nalilni, P. Chandra P. S. 2002.** Effect of heavy metals Co+2, Ni+2 on growths and metabolism of cabbage. **Plant Science** 163: 753-758.
- Peralta, J. R., Gardea-Torresdey, J. L., Tiemann, K. J., Gomez, E., Arteaga, S., Rascon, E. and Parsons, J. G. 2001.** Uptake and effects of five heavy metals on seed germination and plant growth in alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology** 66 (6): 727-734.
- Ramezani, F., Shayanfar, A., Tavakkol Afshari, R. and Rashayi, K. 2014.** Effects of silver, nickel, zinc and zinc-copper nanoparticles on germination, seedling establishment and enzyme activity of alfalfa (*Medicago sativa*) seed. **Iranian Journal of Field Crop Science** 45 (1): 107-118. (In Persian with English Abstract).
- Sahu, G. K., Upadhyay, S. and Sahoo, B. B. 2012.** Mercury induced phytotoxicity and oxidative stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) plants. **Physiology and Molecular Biology of Plants** 18 (1): 21-31.
- Saraswat, K. 2017.** Studies on the phyto-toxicity of heavy metal mercury on germination, early seedling growth and biochemical changes in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Journal of Plant Physiology** 1 (1): 22-38.

- Saraswat, K., Parashar, N., Snehlata, Pathak, A. and Sharma R. 2018.** Studies on the phyto-toxicity of heavy metal mercury in wheat (*Triticum Aestivum* L.). I: Germination percentage (GP) and speed of germination index (SGI). **Modern Concepts and Developments in Agronomy** 2 (5): 1-19.
- Shafiq, M., Iqbal, M. Z. and Athar, M. 2008.** Effect of lead and cadmium germination and seedling growth of *Leucaena leucocephala*. **Journal of Applied Science and Environmental Management** 12 (2): 61-66.
- Sharma, A., Jha, A. M., Dubey, R. S. and Pessarakli, M. 2012.** Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plant under stressful conditions. **Journal of Botany** 26: 1-26.
- Shi, Q., Ding, F., Wang, X. and Wei, M. 2007.** Exogenous nitric oxide protect cucumber roots against oxidative stress induced by salt stress. **Plant Physiology and Biochemistry** 45: 542-550.
- Soltani, A., Gholipour, M. and Zeinali, E. 2006.** Seed reserve utilization and seedling growth of wheat as affected by drought and salinity. **Environmental and Experimental Botany** 55: 195-200.
- Sobral-Souza, C., Leite, N. F., Cunha, F. A. B., Pinho, A. I., Albuquerque, R. S., Carneiro, J. N. P., Menezes, I. R. A., Costa, J. G. M., Franco, J. L. and Coutinho, H. D. M. 2014.** Cytoprotective effect against mercury chloride and bioinsecticidal activity of *Eugenia jambolana* Lam. **Arabian Journal Chemistry** 7 (1): 165-170.
- Tavili, A., Saberi, M., Shariari, A. and Heidari, M. 2013.** Salicylic acid effect on *Bromus tomentellus* germination and initial growth properties under cadmium stress. **Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)** 26 (2): 208-216. (In Persian with English Abstract).
- Tewari, R. K., Kumar, P. and Sharma, P. N. 2005.** Sign of oxidative stress in the chlorotic leaves of iron starved plants. **Plant Science** 169: 1037-1045.
- Xiong, Z. T. 1998.** Lead uptake and effects on seed germination and plant growth in a Pb hyperaccumulator *Brassica pekinensis* Rupr. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology** 60: 285-291.
- Yousefi, Z., Kolahi, M., Majd, A. and Jonoubi, P. 2018.** Cadmium effect on morphologic-anatomic characteristics and pigmentation of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) var Cp48-103 in vitro culture. **Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)** 31 (4): 769-781.
- YU Da. 2002.** Effects of heavy metal ions-Hg<sup>2+</sup> on young bud growth and seed germination of wheat. **Journal of Changshu Institute of Technology** 22: 1220-1222.
- Zhou, Z. S, Huang, S. Q., Gou, K., Mehta, S. K., Zhang, P. C. and Yang, Z. M. 2007.** Metabolic adaptations to mercury-induced oxidative stress in roots of *Medicago sativa* L. **Journal of Inorganic Biochemistry** 101 (1): 1-9.
- Zhou, Z. S, Wang, S. J. and Yang, Z. M. 2008.** Biological detection and analysis of mercury toxicity to alfalfa (*Medicago sativa* L.) . plants. **Chemosphere** 70 (8): 1500-1509.





## **Investigation of some germination characteristics, Biochemical traits and expression of antioxidant genes in bread wheat genotypes at seedling stage under mercury metal stress**

**Hourieh Najafi<sup>1</sup>, Saeid Vavabpour<sup>2\*</sup> and Khalil Zainalinezhad<sup>3</sup>**

Received: April 19, 2020

Accepted: July 22, 2020

### **Abstract**

Heavy metal pollution is one of the most important global causes of soil pollution. Metallic contaminants, even in low concentrations, are carcinogenic due to their non-degradable nature and their physiological effects on living organisms and humans. Seed germination is one of the most important stages in the life cycle plants that responds to environmental factors such as biotic and abiotic stresses. The objective of this experiment was to assess the germination characteristics, biochemical traits and expression of antioxidant genes in bread wheat genotypes at seedling stage under mercury metal stress. The experiment was conducted in split plots based on completely randomized design with three replications in which mercury stress in four levels (including no-application as control and application of 5, 10 and 15  $\mu$ M mercury chloride) and wheat genotypes in three levels (including Gonbad, Morvarid and N9108 genotypes) were considered as main- and sub-factors, respectively. The results showed that with increasing mercury chloride stress, germination indices as well as morphological and biochemical traits in all three wheat genotypes had a decreasing trend and this decrease in different genotypes was significantly different. Line N9108 had better conditions under mercury metal stress in terms of all measured traits. The expression of superoxide dismutase and peroxidase genes in line N9108 was also higher than the other genotypes, which can indicate the superiority of this line than the other two wheat genotypes under mercury chloride stress conditions.

**Keywords:** Abiotic stresses, Heavy metals, Peroxidase, Soil pollution, Superoxide dismutase

1. M. Sc. Student, Dept. of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resources, Gorgan, Iran

2. Assoc. Prof., Dept. of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resources, Gorgan, Iran

3. Assist. Prof., Dept. of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resources, Gorgan, Iran

\* Corresponding author: [s.navabpour@gau.ac.ir](mailto:s.navabpour@gau.ac.ir)