

Evaluation of expression of antioxidant genes under mercury metal stress in bread wheat

Saeid Navabpour^{1*}, Hourieh Najafi², Zeynab Vosoo Abdollah³,
Reyhaneh Navabpour⁴

¹ Corresponding author, Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran, Email: s.navabpour@yahoo.com

² PhD Student in Plant Genetics and Breeding, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran, Email: horeyeh.1372@gmail.com

³ MSc Student in Agricultural Biotechnology, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. Email: zeynab.vosoo@yahoo.com

⁴ BSc Student in Cellular and Molecular Biology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, Email: ellhaawm.a96@gmail.com

Article Info

Article type:

Research Full Paper

Article history:

Received: 2024-6-23

Accepted: 2024-12-22

Keywords:

Mercury chloride stress

Antioxidant genes

Wheat

Biochemical properties

ABSTRACT

Background and purpose: Environmental pollution caused by heavy metals is a major concern in agricultural soils due to their indestructibility. This poses a threat to food security. Mercury, in particular, is considered a dangerous and carcinogenic pollutant that is increased by human activities in natural ecosystems. This can result in a decrease in protein production, deactivation of some enzymes and distribution of various cellular reactions, ultimately leading to stunted growth and development. The contamination of agricultural lands with heavy metals not only decreases the quality of agricultural products, but also poses a serious threat to human health, therefore it requires more attention.

Materials and methods: A split-plot experiment was conducted at the Faculty of Plant Production of Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. The experiment followed a completely randomized basic design with three replications. The factors investigated were cultivar (Morvarid, Gonbad, Ehsan, Baharan) and foliar spraying treatment (fogging), mercury chloride compound (at 5, 10, 15 micromolar levels) and a control treatment. The treatments were applied to leaves at the range of 60 Zadex stage (8 leaves). Afterward, biochemical traits and the expression of catalase, superoxide dismutase, guaiacol peroxidase, and ascorbate peroxidase genes were analyzed.

Results: The results of the analysis of variance showed that the concentrations of mercury and the cultivar had a statistically significant effect on all measured biochemical traits at the 1% probability level. Additionally, the cultivar had a significant effect on chlorophyll a at 5% level. The interaction between mercury and cultivar also had a significant effect on all biochemical traits. Furthermore, it was observed that the expression of ascorbate peroxidase, guaiacol peroxidase and catalase as well as superoxide dismutase genes, showed a higher level of expression. This increase in

expression varied among different cultivars, with the Morvarid cultivar showing a higher increase compared to other cultivars.

Conclusion: In the results, it was observed that the expression levels of the ascorbate peroxidase and giagol peroxidase genes were higher in the Morvarid genotype. Additionally, a lower decrease in the amount of chlorophyll was also observed in this genotype. Furthermore, the level of cellular oxidation was found to increase less in this genotype due to the increase in mercury chloride concentration. Based on the results of this research, it can be concluded that the Morvarid genotype is tolerant to mercury chloride stress. This makes it a desirable cultivar for future breeding projects, but further tests should be conducted to confirm these findings.

Cite this article: Navabpour, S., Najafi, H., Vosoo Abdollah, Z., Navabpour, R. 2025. Evaluation of expression of antioxidant genes under mercury metal stress in bread wheat. *Crop Production Journal*, 17 (4), 67-84.



© The Author(s).

DOI: 10.22069/ejcp.2025.22610.2634

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources



ارزیابی بیان ژن‌های آنتی اکسیدان تحت تنش فلز جیوه در گندم نان

سعید نواب پور^{۱*}، حوریه نجفی^۲، زینب وسو عبدالله^۳، ریحانه نواب پور^۴

^۱ نویسنده مسئول، استاد گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی گرگان و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران، رایانامه: s.navabpour@yahoo.com

^۲ دانشجوی دکتری ژنتیک و بهنجاری گیاهی، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی گرگان و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: horeyeh.1372@gmail.com

^۳ دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی گرگان و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران، رایانامه: zeynab.vosoo@yahoo.com

^۴ دانشجوی کارشناسی زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. رایانامه: ellhaawm.a96@gmail.com

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله:	سابقه و هدف: آلودگی محیطی ناشی از فلزات سنگین به دلیل تجزیه ناپذیری یک نگرانی اصلی در خاک های کشاورزی است که امنیت غذایی را تهدید می کند. جیوه از جمله آلاینده خطرناک و سرطانزا به شمار می رود که در اکوسیستم های طبیعی میزان آن توسط فعالیت های انسانی افزایش یافته و منجر به کاهش تولید پروتئین، غیرفعال سازی برخی از آنزیم ها، ایجاد اختلال در انواع واکنش ها و اعمال سلولی و باعث توقف رشد و نمو می شوند. از آنجایی که آلوده شدن زمین های زراعی با فلزات سنگین از یک طرف منجر به کاهش کیفیت محصولات کشاورزی و از طرف دیگر تهدیدی جدی برای سلامت انسان است، نیازمند توجه بیشتری است.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۴/۳	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۲	
واژه های کلیدی:	مواد و روش: آزمایشی به صورت اسپلت پلات در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار در دانشکده تولید گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان اجرا شد. فاکتورهای مورد بررسی شامل رقم (مروارید، گنبد، احسان، بهاران) و تیمار محلول پاشی (مه پاش) ترکیب کلرید جیوه (در سطح ۵، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار) و تیمار شاهد می باشد و اعمال تیمارها بر روی برگ در محدوده مرحله ۶۰ زادکس (۸ برگی) انجام شد. سپس برخی صفات بیوشیمیایی و بیان ژن های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز مورد بررسی قرار گرفت.
تنش کلرید جیوه	
ژن های آنتی اکسیدان	
گندم	
صفات بیوشیمیایی	
	یافته ها: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر غلظت های مختلف جیوه و اثر رقم بر روی همه صفات بیوشیمیایی اندازه گیری شده از لحاظ آماری در سطح احتمال یک درصد معنی دار شد، اثر رقم برای کلروفیل a در سطح پنج درصد معنی دار شد. اثر متقابل جیوه در رقم برای همه صفات بیوشیمیایی معنی دار گردید. همچنین مشاهده شد که بیان ژن های آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز و کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز با افزایش غلظت تیمار کلرید جیوه بیان

بیشتری از خود نشان دادند که این افزایش بیان در بین ارقام مختلف متفاوت بود و در رقم مروارید بیشتر از ارقام دیگر مشاهده شد.

نتیجه گیری: در نتایج مشاهده گردید میزان بیان ژن آسکوربات پراکسیداز و گلیکول پراکسیداز در ژنوتیپ مروارید بیشتر بود و کاهش کمتری از نظر مقدار کلروفیل نیز در آن مشاهده گردید. از طرفی سطح اکسیداسیون سلولی نیز در این ژنوتیپ افزایش کمتری تحت تأثیر افزایش غلظت کلرید جیوه داشت. براساس نتایج این تحقیق می توان بیان نمود این رقم متحمل به تنش کلرید جیوه بوده که می توان پس از انجام سایر آزمایش های تکمیلی از آن ها در پروژه های اصلاحی بعدی به عنوان ارقام مطلوب در تحمل به تنش کلرید جیوه بهره برد.

استناد: نواب پور، سعید؛ نجفی، حوریه؛ وسو عبدالله، زینب؛ نواب پور، ریحانه. (۱۴۰۳). ارزیابی بیان ژن های آنتی اکسیدان تحت تنش فلز جیوه در گندم نان. *مجله تولید گیاهان زراعی*، ۱۷ (۴)، ۸۴-۶۷.



© نویسندگان.

DOI: 10.22069/ejcp.2025.22610.2634

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

مقدمه

افزایش تقاضا برای تولید مواد غذایی جهانی خواهد شد، انتظارات بیشتر تولیدات کشاورزی در هر واحد زراعی سبب تخریب زمین‌های موجود، گسترش کشاورزی به مناطق حاشیه‌ای و استفاده از انواع خاک برای تولید محصول بیشتر خواهد شد. اکثر این مناطق و زمین‌ها، آلوده به طیف وسیعی از آلاینده‌ها می‌باشند که فلزات سنگین مانند جیوه، کادمیوم، سرب، کروم، مس، منگنز و روی سهم عمده‌ای از آلودگی این خاک‌ها را به خود اختصاص می‌دهند (۱). جیوه به عنوان یکی از مهم‌ترین فلز سنگین سمی در طبیعت شناخته شده است (۲). اگرچه جیوه در پوسته زمین وجود دارد، در غلظت‌های پایین، فعالیت‌های انسانی مانند استخراج، سوزاندن سوخت‌های فسیلی، انتشار ضایعات صنعتی در محیط‌های آبی باعث افزایش سطح جیوه در اتمسفر، خاک و آب می‌شود (۳) آلودگی فلزات سنگین یکی از تهدیدات محیطی است که باعث کاهش بهره‌وری گیاه می‌شود. بیشتر فعالیت‌های انسانی و صنعتی شدن موجب افزایش سریع منابع فلزات سنگین در محیط طبیعی شد (۴). برای بقای گیاهان و حیوانات به فلزات سنگین نیاز است. با این حال، غلظت بالای آن‌ها ممکن است رشد و فرآیندهای متابولیک را مهار کند. در میان فلزات سنگین، برخی از فلزات مانند جیوه و غیره حتی به صورت جزئی برای رشد گیاه مضر هستند. علاوه بر این، این فلزات سنگین مضر در محصولات انباشته می‌شوند و در نتیجه باعث آسیب به گیاهان و سلامت حیوانات می‌شوند (۵). جیوه با تجمع در دیواره سلولی و ورود به سیتوپلاسم سبب تنش اکسیداتیو شده که به دنبال آن گونه‌های فعال اکسیژن واکنش‌گر در گیاهان تولید می‌شود. این فرآیند سبب آسیب در ساختار لیپیدهای غشایی شده و متابولیسم سلولی را دچار اختلال می‌کند، این عنصر همچنین فعالیت

میتوکندری‌ها را متوقف می‌سازد (۶). سمّیتی جیوه در اثر افزایش این عنصر در محیط رشد گیاه، باعث کاهش پتانسیل آبی، اختلال در تغذیه گیاه، تغییر در تراوایی غشای سلولی، توقف رشد ریشه و ساقه و کاهش در تولید پروتئین و جوانه‌زنی می‌گردد (۷). گونه‌های فعال اکسیژن موجب اثرات سمی در گیاهان مانند کاهش رشد، کاهش میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی و در نتیجه فتوسنتز، مهار فعالیت‌های آنزیمی، اثرات مخرب در مولکول‌های زیستی نظیر لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک به خصوص DNA و پراکسیداسیون غشایی که از دست دادن یون‌ها را به همراه دارد (۸). همچنین تجمع گونه‌های فعال اکسیژن در سلول منجر به فعال کردن مسیره‌های سیگنال‌دهی اختصاصی شده که با اکسید کردن پروتئین‌های خاص و تأثیر بر عوامل رونویسی سبب تغییر الگوی بیان ژن‌ها در پاسخ به تنش شده و در نهایت سلول را برای سازگاری به شرایط جدید آماده می‌کند (۹). باتوجه به اینکه تولید آنتی‌اکسیدان‌ها یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های درون سلولی برای کاهش اثرات تنش در گیاهان می‌باشند، در همین راستا این تحقیق به منظور ارزیابی الگوی بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدان و همچنین اندازه‌گیری شاخص‌های بیوشیمیایی که به‌عنوان شاخص‌های تحمل به تنش‌ها شناخته می‌شوند در چند رقم گندم نان تحت تنش کلرید جیوه مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

بدور ارقام گندم مورد آزمایش شامل گنبد، احسان، بهاران و مروارید با اتانول ۱۰ درصد ضدعفونی و در گلدان‌هایی با ظرفیت ۷ کیلوگرم خاک در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان کاشته شدند. آزمایش به صورت تکراردار (چهار تکرار) اجرا شد. در مرحله ظهور سنبله، ایجاد

شده با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر مورد بررسی قرار گرفت. کیفیت RNA با توجه به شاخص A260/280 ارزیابی شد.

ساخت cDNA: سنتز cDNA با روش پیشنهادی شرکت فرمتناز صورت گرفت و به وسیله آغازگرهای ژن خانه دار *GAPDH* با استفاده از PCR، cDNA سنتز شده آزمون گردید.

طراحی آغازگرها: آغازگرهای مورد نیاز بر اساس اطلاعات موجود در سایت NCBI و با استفاده از نرم افزار پرایمر ۳ و در نظر گرفتن خصوصیات مطلوب برای استفاده در روش QRT-PCR طراحی شدند. به منظور نرمال سازی داده‌ها از ژن خانه دار *GAPDH* که دارای بیان یکسانی در تمام تیمارها می‌باشد، استفاده شد (۱۰).

تنش اکسیداتیو با محلول پاشی کلرید جیوه در غلظت‌های ۰، ۵، ۱۰، ۱۵، میکرومولار انجام شد. برای اندازه‌گیری سطوح بیان ژن‌ها و صفات بیوشیمیایی، نمونه برگ در تیمارهای متفاوت برداشت شد. نمونه‌های برگ تا زمان اندازه‌گیری متغیرها در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. میزان بیان ژن‌های سطح بیان ژن‌های پاداکسیدان مانند کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز از تکنیک Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفت.

استخراج RNA و تعیین کمیت و کیفیت: ابتدا استخراج RNA با استفاده از بافر استخراج پی بایوزول شرکت بیوفلکس (توکیو، ژاپن) صورت گرفت. کیفیت RNA استخراج شده، توسط الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد تعیین گردید. کمیت RNA استخراج

جدول ۱- توالی آغازگرها

Table 1- Sequence of primers

Initiator name	Primer sequence
<i>FOR CAT1</i>	5'- TAAGGCCAGACAATGTCAGTG-3'
<i>REV CAT</i>	5'- CAGTGGCATTAAATACGCCAGTA-3'
<i>FOR GAPDH</i>	5'-TCACCACCGACTACATGACC-3'
<i>REV GAPDH</i>	5'-ACAGCAACCTCCTTCTCACC-3'
<i>FOR APXI</i>	5'- AGTACATTGCCCGTGGTACTCT-3'
<i>REV APXI</i>	5'- CGCATTTCATACCAACACATCT-3'
<i>FOR GPX</i>	5'-CCC CCT GTA CAA GTT CCT GA-3'
<i>REV GPX</i>	5'-GTC AAC AAC GTG ACC CTC CT-3'
<i>FOR SOD</i>	5'-GTCACCGCTGGAGAAGATGG-3'
<i>REV SOD</i>	5'-GATGATCCCGCAAGCAACAC-3'

موج‌های ۶۶۳ و ۶۴۵ نانومتر جذب محلول اندازه‌گیری شد و میزان کلروفیل a و b از فرمول‌های زیر محاسبه گردید.

$$\text{Chla (mgml}^{-1}\text{)} = 12.25\text{A}663.6 - 2.55\text{A}646.6$$

$$\text{Chlb (mgml}^{-1}\text{)} = 20.31\text{A}646.6 - 4.91\text{A}663.6$$

میزان TBARM^۱ (شاخص اکسیداسیون سلولی) از روش هگگ و همکاران (۱۹۹۰) استفاده شد (۱۲). مقدار ۰/۵ گرم برگ هموژنیزه و یک میلی لیتر

اندازه‌گیری صفات بیوشیمیایی: برای اندازه‌گیری کلروفیل از روش پورا و همکاران (۱۹۸۹) استفاده شد (۱۱). برای استخراج کلروفیل ۰/۵ گرم از بافت برگ یخ زده با ۱۰ میلی لیتر استون ۸۰ درصد مخلوط شده و به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر WAP مدل UV/vis2000S، در طول

1. Thiobarbituric Acid Reactive Materia

نسبت به یک ژن خانه‌دار که در اینجا *GHAPDH* بود و در تمام مراحل رشدی گیاه و تحت همه شرایط بیان یکسانی داشت می‌سنجند. در پایان واکنش و پس از دریافت نمودارها، اطلاعات به نرم‌افزار REST منتقل شده و تجزیه داده‌ها انجام گرفت.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر غلظت‌های مختلف جیوه و اثر رقم بر روی همه صفات بیوشیمیایی اندازه‌گیری شده از لحاظ آماری در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد، اثر رقم برای کلروفیل a در سطح پنج درصد معنی‌دار شد. اثر متقابل جیوه در رقم برای همه صفات بیوشیمیایی معنی‌دار گردید (جدول ۲).

نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل جیوه در ژنوتیپ نشان داده است که محتوای کلروفیل a و b با افزایش غلظت کلرید جیوه در ژنوتیپ‌های مختلف تحت تیمار غلظت‌های مختلف جیوه کاهش یافت (شکل ۱ و ۲). میزان کاهش کلروفیل a و b در ژنوتیپ بهاران (به ترتیب ۲/۷ و ۱/۶ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در غلظت ۱۵ میلی‌مولار بیشتر از ژنوتیپ‌های دیگر بود و اختلاف آن نیز با سایر ژنوتیپ‌ها در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار گردید. رنگدانه‌های فتوسنتزی اصلی‌ترین و اساسی‌ترین مواد در فرآیند فتوسنتز هستند و از این رو، نقش مهمی در ایجاد غذای گیاهی دارند. توسط گیاهان در طول چرخه تولید ایجاد می‌شود تا نیازهای غذایی آنها را برآورده کند. در پژوهشی سمیت Hg منجر به کاهش قابل توجهی در تولید کلروفیل و کاروتنوئیدها در برگ گندم شد (۱۴).

اسیدتری کلرواستیک (15% w/v) به آن اضافه شد. محلول حاضر پس از افزودن ۱۰ میلی لیتر استون به شدت مخلوط شد و با دور ۴۷۵۰ در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. رسوب کوچک حاصل از سانتریفوژ با ۵ میلی لیتر استون شستشو شد، پس از ورتکس مجدداً با همان دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد، آخرین مرحله چهار مرتبه تکرار شد. سپس به آن مقدار ۳ میلی لیتر اسید فسفریک (1% w/v) و یک میلی لیتر اسید تیوباربیوریتیک (0.6% w/v) افزوده و محلول برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. واکنش با سرد کردن سریع لوله‌ها در داخل یخ متوقف شد و مقدار جذب محلول حاصل را با طول موج ۵۳۲ و ۵۹۰ نانومتر توسط دستگاه جذب نوری (BR-Technologies مدل BT 600) اندازه‌گیری گردید.

تجزیه داده‌ها: داده‌های بدست آمده از صفات بیوشیمیایی، توسط نرم‌افزار آماری SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت مقایسه میانگین داده‌ها به روش آزمون LSD انجام شد و نمودارها توسط نرم‌افزار Excel رسم گردید. بیان نسبی ژن‌های مورد بررسی با استفاده از فرمول پفاف و همکاران (۲۰۰۲) زیر محاسبه گردید (۱۳).

$$Ratio = \frac{(E_{target})^{\Delta CP_{target}(control-sample)}}{(E_{ref})^{\Delta CP_{ref}(control-sample)}}$$

در این معادله نسبت سطح بیان یک ژن هدف بر اساس راندمان واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (E) برای ژن هدف و مرجع و تفاوت (Δ) نقطه تقاطع (CP) یک نمونه ناشناخته در مقابل کنترل ($\Delta CP_{control-sample}$) محاسبه می‌شود. ارزیابی میزان بیان ژن توسط نرم‌افزار Excel و REST انجام شد. در این آزمایش، نمونه‌ها را

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس میانگین مربعات متغیرهای اندازه‌گیری شده در ۴ رقم گندم تحت چهار شرایط متفاوت تنش کلرید جیوه.

Table 2. The results of mean square variance analysis of measured variables in 4 wheat cultivars under four different conditions of mercury chloride stress

sov	df	اکسیداسیون سلولی Cellular oxidation	میزان کلروفیل chlorophyll b	میزان کلروفیل chlorophyll a
بلوک Block	2	0/9473 ^{ns}	10/00661 ^{ns}	15/5 ^{ns}
تنش Stress	3	954/42 ^{**}	18809/1 ^{**}	197 ^{**}
خطای ۱ Error 1	6	27/47	44632/2	917/2
رقم variety	3	115/770 ^{**}	31300/7 ^{**}	29/3 [*]
تنش×رقم variety× Stress	9	27/77 ^{**}	31217/8 ^{**}	31/3 ^{**}
خطای ۲ Error 2	16	8/95	11	8/5
Cv (%)	-	8/97	22/8	6/93

*, **, ns و به ترتیب بیانگر معنی‌دار در سطح پنج و یک درصد و غیر معنی‌دار

**, * and ns respectively indicate significance at the level of five and one percent and non-significance

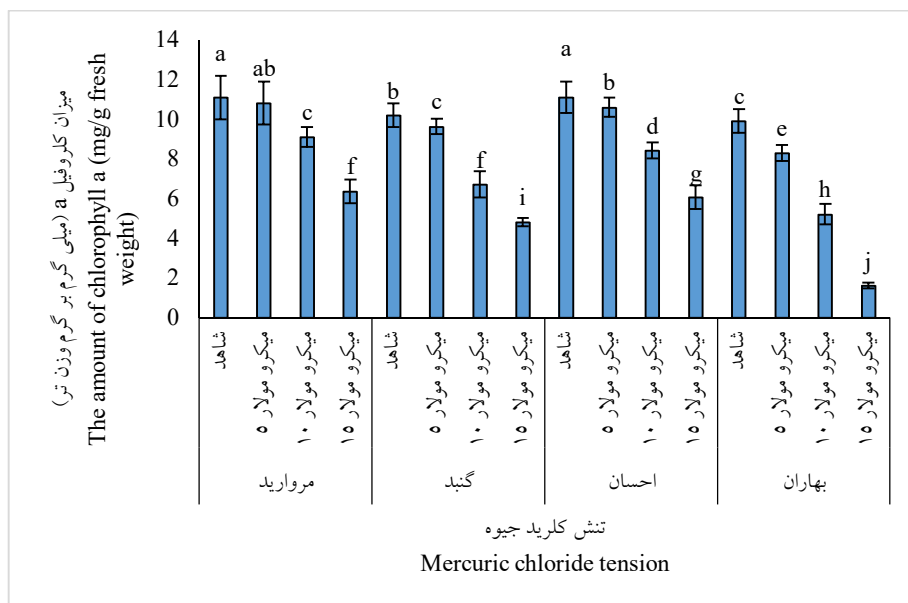
کلروفیل در *Brassica napus* را در نتیجه قرار گرفتن در معرض جیوه نشان می‌دهد (۱۸). همچنین فلزات سنگین معمولاً از طریق مهار فعالیت آنزیم فرآیندهای متابولیکی را ممانعت می‌کنند، برای مثال کادمیوم با مهار فعالیت آنزیم پروتوکلروفیلید ردوکتاز با واسطه برهمکنش با گروه‌های سولفیدریل و نیز مهار آنزیم آمینولولینیک اسید (ALA) سنتاز باعث کاهش کلروفیل می‌شود (۱۹).

نتایج مقایسه میانگین‌ها برای اثر متقابل جیوه در ژنوتیپ بر روی میزان اکسیداسیون سلولی نشان داد (شکل ۳) که محتوای TBARM در غلظت ۱۵ میلی مولار کلرید جیوه به‌طور معنی‌داری (در سطح احتمال ۵ درصد آزمون LSD) بیشتر از سایر غلظت‌ها بود و این افزایش در رقم بهاران و گنبد بیشتر از ژنوتیپ‌های مروارید و احسان دیده شد. این نتایج نشان می‌دهد که آسیب اکسیداتیو به غشا زمانی که گیاهان گندم در معرض غلظت‌های بالاتر کلرید جیوه قرار می‌گیرند بیشتر می‌شود. ساها و همکاران (۲۰۱۱) در مطالعات

ساها و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند تیمار گیاهان با ۲/۵ میلی مولار کلرید جیوه باعث افزایش محتوای کلروفیل شد، اما با افزایش بیشتر غلظت کلرید جیوه مقدار کلروفیل به‌طور قابل‌توجهی کاهش یافت (۱۵) که با نتایج حاصل از این مطالعه مطابقت داشت. به نظر می‌رسد جایگزین شدن یون منیزیم مرکزی کلروفیل به‌وسیله فلزات سنگین صدمه دیگری است که باعث جلوگیری از به دام انداختن نور فتوسنتزی و در نتیجه از بین رفتن کلروفیل و کاهش فعالیت فتوسنتزی می‌شود. کاهش محتوای کلروفیل می‌تواند دلیلی مستقیم برای کاهش فعالیت فتوسنتزی و در نتیجه کاهش تثبیت کربن در اثر غلظت‌های بالای فلزات سنگین باشد (۱۶). پارلاک (۲۰۱۶) گزارش کرد که محتوای کلروفیل با افزایش غلظت نیکل در برگ‌های گندم کاهش معنی‌داری داشته است که با نتایج حاصل از این پژوهش مطابقت دارد (۱۷). همچنین یافته‌های مطالعه حاضر از مطالعات قبلی در گیاهان دیگر حمایت می‌کند که کاهش غلظت

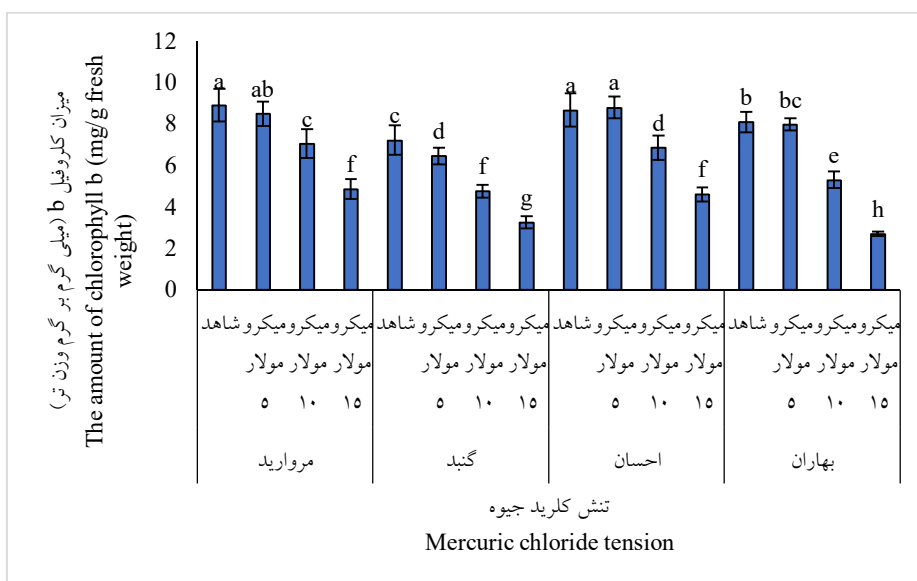
مالون‌دی‌آلدهید ۵۸ درصد افزایش یافت که با نتایج حاصل در این تحقیق مطابقت داشت. پراکسیداسیون لیپید تحت تأثیر جیوه در برخی از دیگر محصولات زراعی نظیر گوجه‌فرنگی (۲۰)، خردل (۲۱) و یونجه (۶) گزارش شده است.

خود بر روی گندم نشان دادند که میزان مالون‌دی‌آلدهید در ریشه گندم تحت تیمار ۱۰ و ۲۵ میکرومولار کلرید جیوه به ترتیب ۴۵ و ۶۱ درصد افزایش یافت (۱۵). در برگ گیاهانی که تحت تیمار ۲۵ میکرومولار کلرید جیوه بودند میزان



شکل ۱- تغییرات میزان کلروفیل a تحت غلظت های مختلف تنش کلرید جیوه در ارقام مختلف گندم

Figure 1. Changes in the amount of chlorophyll a under different concentrations of chloride-mercury stress in different wheat cultivars

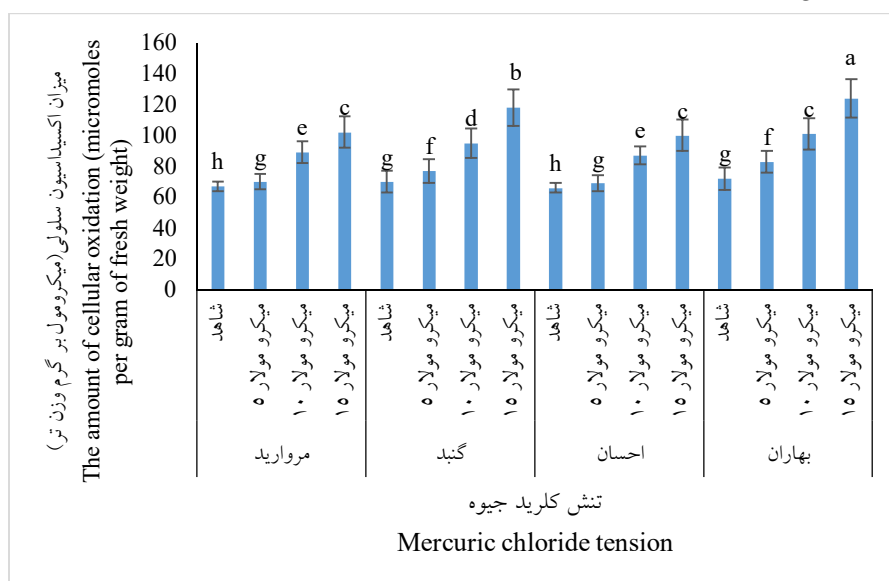


شکل ۲- تغییرات میزان کلروفیل b تحت غلظت های مختلف تنش کلرید جیوه در ارقام مختلف گندم

Figure 2. Changes in the amount of chlorophyll b under different concentrations of chloride-mercury stress in different wheat cultivars

(۲۰۱۲) گزارش کردند که در گیاه گندم با افزایش غلظت سرب محتوای TBARM افزایش یافت (۲۶). زمانی رادیکال‌های آزاد اکسیژن از حالت نرمال خارج میشوند سبب افزایش تولید مالون دآلدئید در گیاه خواهد شد (۲۷). این امر را به فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نسبت می‌دهند تا سطح H_2O_2 را کاهش دهد و بنابراین آسیب سلولی به غشاها را به حداقل برساند (۲۸). غلظت TBARM ناشی از پراکسیداسیون لیپیدها، دلالت بر ایجاد رادیکال‌های آزاد در بافت است. اگرچه فرآیندهای تولید ROS در شرایط نرمال آهسته است، اما تنش سبب افزایش تولید آن‌ها می‌شود (۲۶). لذا گونه‌های فعال اکسیژن سبب القای تنش اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی در گیاه می‌شوند (۲۹).

در هر یک از غلظت‌ها محتوای TBARM در ژنوتیپ‌های مختلف با یکدیگر تفاوت معنی‌دار آماری در سطح احتمال ۵ درصد داشتند. فلزات سنگین، مانند متالوئیدها، با ترویج تولید رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن در استرس اکسیداتیو نقش دارند. در مطالعه‌ای، گیاهان گندم تحت تنش جیوه قرار داشتند، H_2O_2 و TBARM بیشتری تولید کردند. گیاهانی که در معرض تنش جیوه قرار داشتند سطوح بالاتری از H_2O_2 و TBARM داشتند (۲۲). این نتایج با نتایجی مطابقت دارد که نشان می‌دهد سمیت جیوه و نیکل باعث افزایش محتوای H_2O_2 و MDA در گونه‌های سویا، ذرت و آلیوم می‌شود (۲۳ و ۲۴). گزارش شده است که با افزایش میزان پراکسیداسیون لیپید در گیاهان تحت تنش کادمیوم، فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز افزایش می‌یابد (۲۵). کاتور و همکاران



شکل ۳- تغییرات میزان اکسیداسیون سلولی تحت غلظت‌های مختلف تنش کلرید جیوه در ارقام مختلف گندم

Figure 3. Changes in cell oxidation rate under different concentrations of chloride-mercury stress in different wheat cultivars

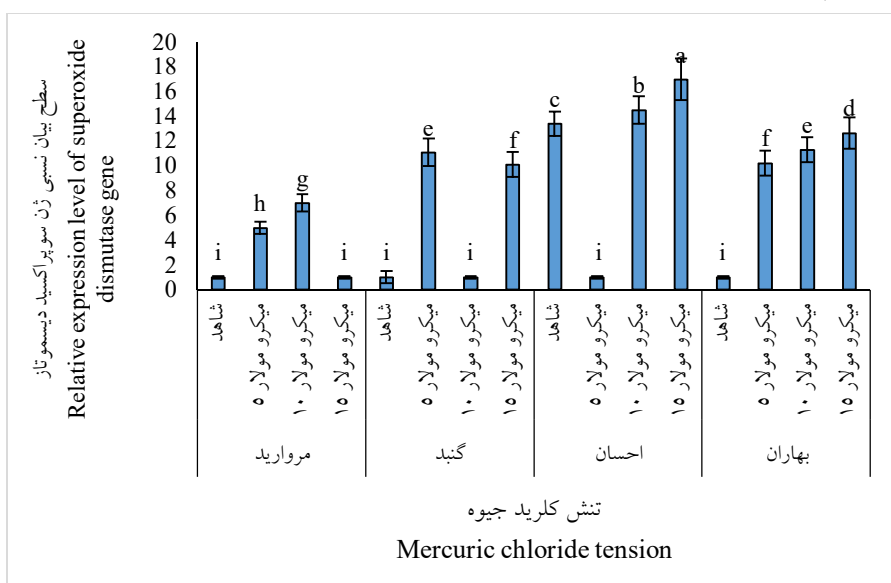
میکرومولار تنش جیوه در رقم احسان که این مقدار با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت. دیده شد. در رقم بهاران اختلاف معنی‌داری بین تنش ۱۰ و ۱۵ میکرومولار کلرید جیوه دیده نشد و مقدار تغییر

مقدار بیان ژن سوپراکسید دیسموتاز طی تنش کلرید جیوه در ارقام مختلف گندم با افزایش شدت تنش افزایش بیان قابل توجهی نسبت به شاهد نشان داد. بیشترین مقدار بیان ژن تحت تیمار ۱۵

دفاعی در برابر تنش‌های اکسیداتیو می‌باشند که تغییر موازنه O_2^- به O_2 و H_2O_2 را کاتالیز می‌کند (۳۰). با توجه به مطالعات گذشته فعالیت ژن SOD در اندام هوایی و ریشه گندم تحت تنش جیوه افزایش یافت (۳۱). در پژوهشی دیگر، ژن SOD با افزایش شدت تنش جیوه از یک تا ۸ میلی مولار، افزایش بیان قابل توجهی در گیاه *Chlamydomonas reinhardtii* نشان داد که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت داشت (۳۲). در گوجه‌فرنگی هم تحمل به تنش به فعالیت ژن SOD نسبت داده شده است (۳۳). افزایش فعالیت SOD و POX در گیاهان تیمار شده با $HgCl_2$ در ارتباط با کاهش ROS نشان دهنده نقش مهم این ژن‌ها در کاهش سمیت جیوه است (۳۴). در مطالعه اقبال (۲۰۱۵) سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و گلوکاتیون ردوکتاز (GR) تحت تیمار جیوه افزایش بیان داشتند (۳۵).

شدت تنش در این رقم تاثیر قابل توجهی نداشت (شکل ۴).

در واقع سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی، یکی از مکانیسم‌های اصلی سمیت زدایی فلزات سنگین در گیاهان می‌باشند که میزان فعالیت این آنزیم‌ها بسته به مدت و نوع تنش، گونه گیاهی و بخش‌های گیاهی متفاوت است، سوپراکسید دیسموتاز یکی از اولین آنزیم‌های درگیر در این فرآیند است که در این پژوهش مقادیر آن بخصوص در غلظت‌های بالاتر کلرید جیوه افزایش قابل ملاحظه‌ای داشته است (شکل ۴). همچنین افزایش فعالیت آنزیم به دلیل افزایش سوپراکسید می‌باشد که سبب افزایش سنتز novo de از پروتئین‌های آنزیمی می‌شود. احتمالاً یون‌های سوپراکسید از طریق نقش سیگنالی سبب افزایش بیان ژن‌های سوپراکسید دیسموتاز می‌شوند (۴). سوپر اکسید دیسموتازها اولین خط



شکل ۴- میزان بیان نسبی ژن سوپراکسید دیسموتاز تحت غلظت‌های مختلف تنش کلرید جیوه در ارقام مختلف گندم

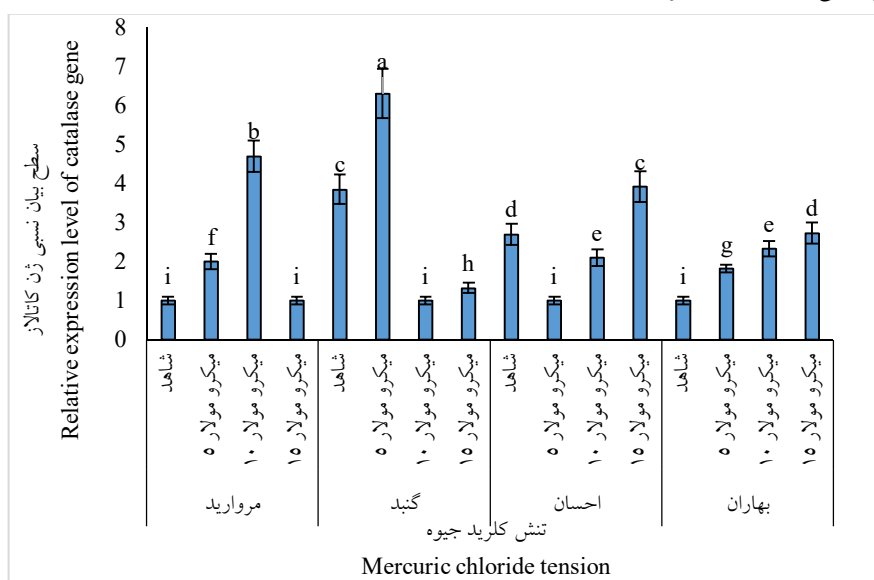
Figure 4. The relative expression level of superoxide dismutase gene under different concentrations of chloride-mercury stress in different wheat cultivars

میکرومولار، طی نمونه‌گیری اول بدست آمد که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها داشت (شکل ۵). قابل ذکر است که در چند پژوهش انجام شده، نشان

بیان ژن کاتالاز طی تنش کلرید جیوه در هر ۴ رقم، افزایش بیان با افزایش میزان تنش داشت. بیشترین مقدار بیان ژن در رقم گند در طی تنش ۱۵

لقا می‌شود تا آنزیم CAT را رمزگذاری و ROS تولید شده در شرایط تنش را از بین ببرد (۳۹). همچنین پراکسید هیدروژن (H_2O_2) تولید شده توسط کاتالاز که در گیاهان و موجودات هوایی دیگر یافت می‌شود، تجزیه می‌شود؛ در حقیقت کاتالاز، پراکسید هیدروژن را به محصول بی‌ضرر شامل آب و اکسیژن تبدیل می‌کند (۴۰). افزایش فعالیت کاتالاز در تیمار با فلزات سنگین به دلیل افزایش تولید سوبسترای آن مانند پراکسید هیدروژن در سلول‌های گیاهی و به‌منظور مقابله با شرایط تنش می‌باشد (۸).

داده شد که بیان ژن‌های کاتالاز به‌طور زمانی و مکانی تعدیل می‌شود و به عوامل محیطی مختلفی پاسخ می‌دهد (۳۶). رئیسی و جهان بخش (۲۰۱۴) در مطالعات خود نشان دادند که در رقم تجن گندم فعالیت کاتالاز تحت تیمار کلرید جیوه ۱۰ و ۲۰ میکرو مولار افزایش یافت (۳۷). در مطالعه‌ای تیمار جیوه به‌طور قابل توجهی باعث افزایش سطح بیان کاتالاز و سوپر اکسید در مقایسه با تیمار شاهد در گیاه ذرت شد (۳۸). استرس اکسیداتیو در غلظت‌های بالای ناشی از فلزات سنگین، سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی گیاهان را تحت فشار قرار می‌دهد و در بیشتر موارد، ژن CAT

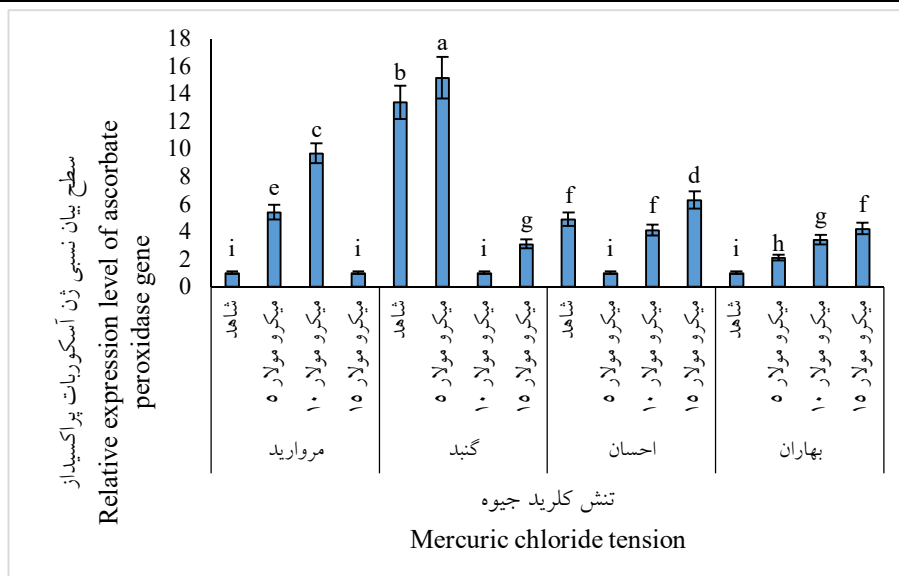


شکل ۵- میزان بیان نسبی ژن کاتالاز تحت غلظت‌های مختلف تنش کلرید جیوه در ارقام مختلف گندم

Figure 5. The relative expression level of catalase gene under different concentrations of chloride-mercury stress in different wheat cultivars

تحقیقات قبلی گزارش شده است که گیاهانی که در معرض غلظت بالایی از فلزات سنگین مانند نیکل، آرسنیک و جیوه هستند، APX بیشتری تولید می‌کنند (۴۱). گیاهان برای رشد و نمو مناسب به APX نیاز دارند (۴۲). سطوح بالاتر APX در گیاهچه‌های برنج تحت تنش آرسنیک مشاهده شده است (۴۳) که از یافته‌های ما حمایت می‌کند.

بررسی بیان ژن آسکوربات پراکسیداز نشان داد که با افزایش تنش، بیان ژن روند افزایشی در رقم بهاران نسبت به شاهد نشان داد. بیشترین مقدار بیان ژن آسکوربات پراکسیداز در رقم گنبد با مقدار ۱۵/۹ تحت تنش ۵ میکرو مولار بدست آمد که اختلاف معنی‌داری با دیگر سطوح تنش و دیگر ارقام تحت تنش داشت. در رقم مروارید هم بیشتر بیان ژن تحت تیمار ۱۰ میکرو مولار جیوه بدست آمد (شکل ۶). در

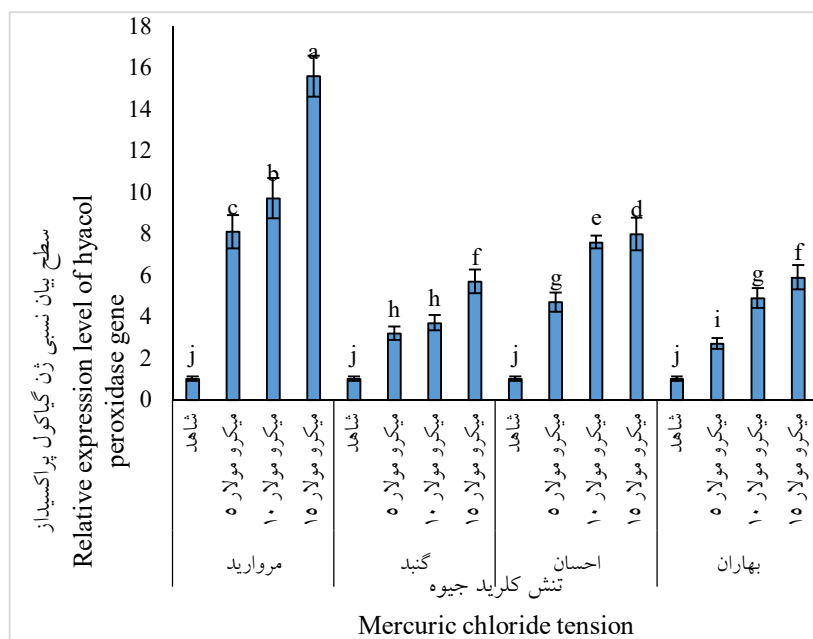


شکل ۶- میزان بیان نسبی ژن آسکوربات پراکسیداز تحت غلظت های مختلف تنش کلریدجیوه در ارقام مختلف گندم

Figure 6. The relative expression level of ascorbate peroxidase gene under different concentrations of chloride-mercury stress in different wheat cultivars

نتایج پژوهش حاضر مطابقت داشت (۳۴). نقطه اشتراک همه تنش‌ها، افزایش ROS ها است و با افزایش ROS سیستم دفاعی گیاه فعال می‌شود؛ یکی از مکانیسم‌هایی که در این سیستم تاثیرگذار است افزایش ژن‌های آنتی‌اکسیدان است. بنابراین دور از انتظار نیست که افزایش سطح ROS با تنش فلزی وجود داشته باشد، همانطور که در جدول تجزیه واریانس هم دیده شد تنش فلزی باعث معنی دار شدن شاخص اکسیداسیون سلولی شد و معنی داری این شاخص به این مفهوم است که ما افزایش میزان ROS را طی تنش داریم و واکنش دفاعی گیاه هم در جهت به تعادل در آوردن ROS ها می‌باشد. در این رابطه یکی از مکانیسم‌ها افزایش فعالیت بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدان است.

ژن گایاکول پراکسیداز بیشتر مقدار بیان را در رقم مروارید تحت تنش ۱۵ میکرو مولار کلرید جیوه با مقدار ۱۵/۶ نشان داد که اختلاف معنی داری با دیگر سطوح تنش داشت. در دیگر ارقام تحت تنش هم بیان ژن روند افزایشی همگام با افزایش سطوح تیمار کلرید جیوه دیده شد (شکل ۷). پراکسیدازها با تبدیل پراکسید هیدروژن به آب از گیاه محافظت می‌کنند و همچنین در مورفوژن و اکسیداسیون اکسین نیز نقش دارند (۴۴). افزایش فعالیت پراکسیداز در تیمار گیاه برنج با ۲۰۰ میکرومولار سرب تایید شده است؛ در واقع با افزایش سرب موجب افزایش آزاد شدن پراکسیداز واقع در دیواره سلول می‌شوند (۴۵). در مطالعه آیسین و همکاران (۲۰۲۰) سطوح mRNA ژن CAT، GR و GPX پس از استفاده از HgCl₂ به طور قابل توجهی در مقایسه با شاهد افزایش یافت که با



شکل ۷- میزان بیان نسبی ژن گیاکول پراکسیداز تحت غلظت های مختلف تنش کلرید جیوه در ارقام مختلف گندم

Figure 7. Relative expression level of guaiacol peroxidase gene under different concentrations of chloride-mercury stress in different wheat cultivars

در نتایج مشاهده گردید میزان بیان ژن آسکوربات پراکسیداز و گیاکول پراکسیداز در ژنوتیپ مروارید بیشتر بود و کاهش کمتری از نظر مقدار کلروفیل نیز در آن مشاهده گردید. از طرفی سطح اکسیداسیون سلولی نیز در این ژنوتیپ افزایش کمتری تحت تأثیر افزایش غلظت کلرید جیوه داشت. بر اساس نتایج این تحقیق می توان بیان نمود این ژنوتیپ متحمل به تنش کلرید جیوه بوده که می توان پس از انجام سایر آزمایش های تکمیلی از آن ها در پروژه های اصلاحی بعدی به عنوان ارقام مطلوب در تحمل به تنش کلرید جیوه بهره برد. همچنین با توجه به اینکه تولید آنتی اکسیدان ها یکی از مهم ترین مکانیسم های درون سلولی برای تخفیف اثرات تنش در گیاهان می باشند، به نظر می رسد تیمارهایی که بتوانند این مکانیسم را تعدیل نمایند و باعث بیان ژن ها آنتی اکسیدان شوند، می توانند از این طریق، اثرات مثبتی را بر گیاهان رشد کرده در مناطق آلوده بگذارند.

نتیجه گیری کلی

کاربرد کلرید جیوه موجب بروز تنش اکسیداتیو گردیده و بر فرآیندهای بیوشیمیایی و بیان ژن ها در ژنوتیپ های مورد مطالعه تأثیرگذار بوده است و همچنین پاسخ ژنوتیپ ها به کاربرد مقادیر مختلف کلرید جیوه متفاوت است. از آنجایی که میزان کلروفیل به عنوان یکی از اولین شاخص هایی که تحت تأثیر تنش اکسیداتیو قرار می گیرد، کاهش آن با افزایش غلظت کلرید جیوه بیانگر افزایش شدت تنش است. همچنین ارزیابی مقدار سطح اکسیداسیون سلولی نیز شاخص مطلوبی جهت بررسی تنش اکسیداتیو بوده که مقدار آن نیز با افزایش غلظت کلرید جیوه افزایش یافت. با توجه به نتایج این آزمایش به نظر می رسد که سیستم دفاع آنتی اکسیدانی از جمله بیان ژن های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز، گیاکول پراکسیداز نقش مهمی در راهکار دفاعی گیاه گندم در برابر تنش فلز جیوه ایفا می کند. همان طور که

References

1. Nagajyoti, P., Lee, K., & Sreekanth, T. (2010). Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental chemistry letters*, 8: 199- 216.
2. Tchounwou, P. B., Yedjou, C.G., Patlolla, A. K., & Sutton, D. J. (2012). Heavy metal toxicity and the environment. Molecular, clinical and environmental toxicology: volume 3: *environmental toxicology*, 133-164.
3. Mahbub K.R., Krishnan, K., Naidu, R., Andrews, S., & Megharaj, M. (2017). Mercury toxicity to terrestrial biota. *Ecological Indicators*, 74: 451-462.
4. Ullah , A., Mushtaq, H., Ali, H., Munis, M.F.H., Javed, MT., & Chaudhary, H.J. (2015). Diazotrophs-assisted phytoremediation of heavy metals: a novel approach. *Environmental Science and Pollution Research*, 22: 2505-2514.
5. Alqahtani, A.S., Ullah, R., & Shahat, A.A. (2022). Bioactive Constituents and Toxicological Evaluation of Selected Antidiabetic Medicinal Plants of Saudi Arabia. *Evid.-Based Complement. Altern. Med*, 7123521.
6. Zhou, Z.S, Huang, S.Q., Gou, K., Mehta, S.K., Zhang, P.C., Yang, Z.M. (2007). Metabolic adaptations to mercury-induced oxidative stress in roots of *Medicago sativa* L. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 101, 1-9.
7. Zhao, Z.S., Wang, S.J., & Yang, Z.M. (2008). Biological detection and analysis of mercury toxicity to alfalfa (*Medicago sativa* L.) plants. *Chemosphere*, 70, 1500-1509.
8. Gill. M. (2014). Heavy metal stress in plants: a review. *International Journal of Advanced Research*, 6(2):1043- 1055.
9. Salehi, M., Kalate, Arabi, M., & Mosavat, S.A. (2014). Evaluation of Genetic Variation in Spring Bread Wheat Genotypes to Salinity in the North of Golestan province. *Seed and Plant Improvement Journal*, 30, 305-325. [In Persian with English summary].
10. Moloudi, F., Navabpour, S., Soltanloo, H., Ramezani, S.S., & Sadeghipour, H. (2013). Catalase and metallothionein genes expression analysis in wheat cultivars under drought stress condition. *Journal of Plant Molecular Breeding*, 1(2), 58-64.
11. Porra, R.J., Thompson, W.A. & Kriedemann, P.E. (1989). Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Bioenergetics*, 975: 384-394. Doi:org/10.1016/S0005-2728(89)80347-0.
12. Hagege, D., Nouvelot, A., Boucard, J., & Gaspar, T. (1990). Malondialdehyde titration with thiobarbiturate in plant extracts: avoidance of pigment interference. *Phytochemical Analysis*, 1, 86-89.
13. Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., & Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic acids research*, 30(9): 36.
14. Ibrahim, M., Nawaz, S., Iqbal, K., Rehman, S., Ullah, R., Nawaz, G., ... & Peluso, I. (2022). Plant-derived smoke solution alleviates cellular oxidative stress caused by arsenic and mercury by modulating the cellular antioxidative defense system in wheat. *Plants*, 11(10), 1379.
15. Sahu, G.K., Upadhyay, S., & Sahoo, B.B. (2011). Mercury induced phytotoxicity and oxidative stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) plants. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 18(1), 21-31.
16. Chehargani Rad, A., Khorzaman, N., Lari Yazdi, H., & Shirkhani, Z. (2016). Changes in vegetative traits and physiological indicators of bean plants under zinc stress in hydroponic cultivation environment. *Developmental Biology*, 8(2), 31-39.
17. Parlak, K.U. (2016). Effect of nickel on growth and biochemical characteristics of wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *NJAS-Wageningen Journal of Life Sciences*, 76, 1-5.
18. Farooq, M.A., Hong, Z., Islam, F., Noor, Y., Hannan, F., Zhang, Y., Ayyaz, A., Mwamba, T.M., Zhou, W., & Song, W. (2020). Comprehensive proteomic analysis of arsenic induced toxicity reveals the mechanism of multilevel coordination of efficient defense and energy metabolism in two Brassica napus cultivars. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2020, 208, 111744.

19. Zengin, F.K., & Munzuroglu, O. (2005). Effects of some antioxidant chemicals in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *Acta Biologica Cracoviensia series Botanica*, 47(2), 157-164.
20. Cho, U., & Park, J. (2000). Mercury-induced oxidative stress in tomato seedlings. *Plant Sciences*. 156, 1–9.
21. Shiyab, S., Chen, J., Fengxiang, X.H., David, L.M., Fank, B.M., Mengmeng, G., Yi, S., Motasim, A.M. (2008). Mercury-induced oxidative stress in Indian mustard (*Brassica juncea* L.), *Environmental Toxicology*, 24: 462–471.
22. Hayat, N., Afroz, N., Rehman, S., Bukhari, S.H., Iqbal, K., Khatoon, A., Taimur, N., Sakhi, S., Ahmad, N., & Ullah, R. (2021). Plant-Derived Smoke Ameliorates Salt Stress in Wheat by Enhancing Expressions of Stress-Responsive Genes and Antioxidant Enzymatic Activity. *Agronomy*, 2021, 12, 28.
23. Stoeva, N., Berova, M., & Zlatev, Z. (2003) Physiological Response of Maize to Arsenic Contamination. *Biol Plant*, 46, 449–452.
24. Manna, I., & Bandyopadhyay, M. (2017). Engineered Nickel Oxide Nanoparticle Causes Substantial Physicochemical Perturbation in Plants. *Front Chem*, 5, 92.
25. Sandalio, L.M., Dalurzo, H.C., Gomez, M., Romero-Puertas, M.C., Del Rio, L.A. (2001). Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany*, 52(364), 2115-2126.
26. Kaur, G., Singh, H.P., Batish, D.R., & Kumar, R.K. (2012). Growth, photosynthetic activity and oxidative stress in wheat (*Triticum aestivum*) after exposure of lead to soil. *Journal of Environmental Biology*, 33, 265-269.
27. Noman, A., Ali, S., Naheed, F., Ali, Q., Farid, M., Rizwan, M., & Irshad, M.K. (2015). Foliar application of ascorbate enhances the physiological and biochemical attributes of maize (*Zea mays* L.) cultivars under drought stress. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 61: 1659-1672.
28. Zhang, C., Luo, L., Xu, W., & Ledwith, V. (2008). Use of local Moran's I and GIS to identify pollution hotspots of Pb in urban soils of Galway. Ireland. *Science of the Total Environment*, 398, 212-221.
29. Verma, S., Dubey, R. (2003). Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science*, 164, 645-655.
30. Qiao, K., Fang, C., Chen, B., Liu, Z., Pan, N., Peng, H., Hao, H., Xu, M., Wu, J., & Liu, S., (2020). Molecular characterization, purification, and antioxidant activity of recombinant superoxide dismutase from the Pacific abalone *Haliotis discus hannai* Ino. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(8).
31. Ibrahim, M., Nawaz, S., Iqbal, K., Rehman, S., Ullah, R., Nawaz, G., ... & Peluso, I. (2022). Plant-derived smoke solution alleviates cellular oxidative stress caused by arsenic and mercury by modulating the cellular antioxidative defense system in wheat. *Plants*, 11(10), 1379.
32. Elbaz, A., Wei, Y.Y., Meng, Q., Zheng, Q., & Yang, Z.M. (2020). Mercury-induced oxidative stress and impact on antioxidant enzymes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Ecotoxicology* , 19, 1285–1293.
33. Gill, M. (2014). Heavy metal stress in plants: a review. *International Journal of Advanced Research*, 6(2):1043- 1055.
34. Aysin, F., Karaman, A., Yilmaz, A., Aksakal, Ö., Gezginçioğlu, E., & Kohnehshahri, S. M. (2020). Exogenous cysteine alleviates mercury stress by promoting antioxidant defence in maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 44(5), 506-516.
35. Iqbal, M. Vicia faba bioassay for environmental toxicity monitoring: A review. *Chemosphere* 2015, 144, 785–802.
36. Chen, Y, Zhou, Y., Cai, Y., Feng, Y., Zhong, C., Fang, Z., & Zhang, Y. (2022). De novo transcriptome analysis of high-salinity stress-induced antioxidant activity and plant phytohormone alterations in *Sesuvium portulacastrum*. *Front. Plant Science*, 13: 855-995.

37. Raeesi, S.Y., & Jahanbakhsh, S. (2014). The effect of cadmium and mercuric chlorides on some physiological traits of wheat two cultivars. *Journal of Crop Production*, 7(4), 179-195. [In Persian with English Summary].
38. Aysin, F., Karaman, A., Yilmaz, A., Aksakal, Ö., Gezginçioğlu, E., & Kohneshahri, S.M. (2020). Exogenous cysteine alleviates mercury stress by promoting antioxidant defence in maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 44(5), 506-516.
39. Lee, S.H., & An, C.S. (2005). Differential expression of three catalase genes in hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Molecules and Cells*, 20: 247-255.
40. Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S., & Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of botany*, 2012(1), 217037.
41. Gajewska, E., & Skłodowska, M. (2007). Differential biochemical responses of wheat shoots and roots to nickel stress: Antioxidative reactions and proline accumulation. *Plant Growth Regul*, 54, 179–188.
42. Nandita, S., Ma, L.Q., Srivastava, M., & Rathinasabapathi, B. (2006). Metabolic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in *Pteris ertici* L. and *Pteris ensiformis* L. *Plant Science*. 2006, 170, 274–282.
43. Manju, S., Kumar, S., Chakrabarty, D., Trivedi, P.K., Mallick, S., Misra, P., Shukla, D., Mishra, S., Srivastava, S., & Tripathi, R.D. (2009). Effect of arsenic on growth, oxidative stress, and antioxidant system in rice seedlings. *Ecotoxicol. Environ. Saf*, 72, 1102–1110.
44. Peng, Y., Huang, H., Zhang, Y., Kang, C., Chen, S., Song, L., Liu, D., & Zhong, C. (2018). A versatile MOF-based trap for heavy metal ion capture and dispersion, *Nature communications*, 9: 187.
45. Malecka, A., Piechalak, A., Mensinger, A., Hanc, D., Baralkiewicz, D., & Tomaszewska, B. (2012). Antioxidative Defense System in *Pisum sativum* Roots Exposed to Heavy Metals (Pb, Cu, Cd, Zn). *Polish Journal Environment Studies*, 21(6): 1721-30.

