ISSN: 2676-7309

Plant Genetic Researches

Volume 11, Issue 2 (2025)

Lorestan University

Research Article

https://doi.org/10.22034/pgr.11.2.1

Expression Analysis of Gluconase and Metallothionein Genes in Two Wheat Cultivars Under Oxidative Stress

Mohammad Ehsani[1], Saeid Navabpour[2,*], Sayedeh Sanaz Ramzanpour[2], Hassan Soltanloo[2] and Asadollah Ahmadikhah[3]

1- Former M.Sc. Student, Department of Plant Breeding and Agricultural Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
2- Associate Professor, Department of Plant Breeding and Agricultural Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
3- Associate Professor, Department of Cellular and Molecular Biology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

[*]***Corresponding author*** ✉: *s.navabpour@gau.ac.ir*

Citation: Ehsani, M., Navabpour, S., Ramzanpour, S.S., Soltanloo, H. and Ahmadikhah, A. (2025). Expression analysis of gluconase and metallothionein genes in two wheat cultivars under oxidative stress. *Plant Genetic Researches*, **11(2):** 1-14. http://dx.doi.org/10.22034/PGR.11.2.1

(Received: February 26, 2024; Final Revised: April 21, 2024; Accepted: April 26, 2024; Published online: March 17, 2025)

Extended abstract

Introduction

Metal stress is a major challenge affecting agricultural production, given the increasing global population and the critical need for food. Heavy metal pollution remains a serious threat to production and quality of wheat (*Triticum aestivum* L.), as a major crop for human nutrition. Understanding the effects of metal stress on plants and their response mechanisms is crucial for optimizing agriculture. Metal stress in plants is commonly induced by heavy metals such as silver, cadmium, lead, and copper. Such heavy metals adversely affect plant growth when present in soil, water, or air. Heavy metal stress can lead to various changes in plant metabolism, including, enzymatic stress, and gene expression alterations. Due to high nutritional requirements and sensitivity to environmental changes, wheat is particularly susceptible to heavy metals-induced stress. Understating the impacts of heavy metals on wheat is crucial for enhancing wheat quality and quantity. Developing resistant varieties and effective agronomic management techniques are crucial to combat wheat production challenges worldwide. This study aimed to explore the impact of silver nitrate ($AgNO_3$) as an oxidative stress agent and DABCO as an antioxidant on different wheat varieties (Flat and Tajan) and the expression of specific genes, metallothionein and glucanase.

Materials and methods

A factorial experiment was conducted in a randomized complete block design with three replications. The experimental factors included silver nitrate at three levels (0, 1, 2 mM) as an oxidative stress factor and DABCO as an antioxidant at three levels (0, 10, 20 mM) on wheat cultivars Falat and Tajan. Biochemical traits assessed included the cell oxidation level index and chlorophyll content, and the expression of gluconase and metallothionein genes was evaluated using Real time qRT-PCR. Total RNA extraction was conducted using Bioflex P-Biosol extraction buffer. The quality of the extracted RNA was assessed by on 1.5% agarose gel electrophoresis. Subsequently, cDNA was synthesized according to Fermentase manufacturer instructors. The quality of cDNA was then assessed by PCR using specific primers for the housekeeping gene *GAPDH*. In order to analyze the expression patterns of the gluconase and metallothionein genes, real time qRT-PCR was performed utilizing CyberGreen I dye. Real-time QRT-PCR analysis was performed using the CyberBioParse kit at Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources in Iran and on an iQ 5 device made in the United States.

©2025 The author(s). This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0), which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source.

Results and discussion

The results of present study demonstrated that under silver nitrate stress, both cultivars showed the highest level of gene expression at 1 mM silver nitrate treatment without DEBCO treatment, followed by significant downregulation at 2 mM silver nitrate treatment. These results may imply that wheat is sensitive to a high oxidative stress levels after silver nitrate treatment. Increased expression of metallothionein and glucanase at lower concentrations may serve as a protective response to oxidative stress, neutralizing oxidant effects and safeguarding cells from metal stress damage. Additionally, at 1 mM silver nitrate treatment, the application of DABCO as an antioxidant, positively influenced associated genes expression, possibly leading to reduced oxidative damage.

Conclusion

The present study demonstrates that silver nitrate, as an oxidative stress inducer, has significant effects on the expression of genes associated with heavy metal stress in wheat. Scientific reports indicate that silver nitrate increases the expression of metallothionein and glucanase genes, where they play a key role in plants' response to environmental stresses. Metallothioneins, as metal-binding proteins, are crucial in neutralizing the toxic effects of heavy metals and reducing oxidative stress. Additionally, glucanases contribute to the breakdown of carbohydrates and may also impact metabolic changes in response to metal stress conditions. The observed gene expression variations at different levels of silver nitrate and types of stresses suggest that wheat can adapt to stress in order to regulate corresponding genes to cope with environmental challenges. These adaptations may lead to genetic changes and natural selection in the long term, potentially enabling plants to survive longer under harsh conditions.
Considering the global significance of wheat as a strategic food crop, the results of this study underscore the necessity for further research in the field of metal stress management. One potential future objective could involve identifying wheat cultivars better equipped to handle metal stresses. These cultivars could be developed through genetic engineering or plant breeding programs to enhance yield and quality of agricultural products. Ultimately, it is crucial for agricultural scientists and researchers to collaborate in order to provide effective solutions to mitigate the negative impacts of metal stress and contribute to sustainable food security in the future. This research could serve as a foundation for developing solutions that not only ensure plant health but also promote the health of agricultural ecosystems.

Keywords: Wheat, Metal stress, Glucanase, Metallothionein, Chlorophyll

پژوهش‌های ژنتیک گیاهی
جلد ۱۱، شماره ۲، ۱۴۰۳
شاپا الکترونیکی: ۷۳۰۹-۲۶۷۶
دانشگاه لرستان
مقاله پژوهشی
https://doi.org/10.22034/pgr.11.2.1

بررسی تغییرات بیان ژن‌های گلوکوناز و متالوتیونین در دو رقم گندم تحت تنش اکسیداتیو

محمد احسانی[۱]، سعید نواب پور[۲*]، سیده ساناز رمضانپور[۲]، حسن سلطانلو[۲] و اسدالله احمدی خواه[۳]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی ومنابع طبیعی گرگان، گرگان
۲- دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی ومنابع طبیعی گرگان، گرگان
۳- دانشیار، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشگاه شهید بهشتی تهران، تهران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۰۷؛ تاریخ آخرین ویرایش: ۱۴۰۳/۰۲/۰۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۰۷؛ تاریخ انتشار برخط: ۱۴۰۳/۱۲/۲۷)

چکیده

تنش فلزی یکی از مشکلات جدی است که تولید محصولات گیاهی را در سراسر جهان محدود می‌کند. تنش فلزی اثرات متعددی از جمله تغییرات فنوتیپی، آنزیمی و بیان ژنی در گیاهان دارد. گندم یک محصول راهبردی در تغذیه انسان به‌شمار می‌رود و افزایش روزافزون جمعیت جهانی مستلزم تولید بیشتر محصولات کشاورزی است. با توسعه سریع صنعت و کشاورزی مدرن، آلودگی فلزات سنگین در نتیجه فعالیت‌های انسانی به یکی از چالش‌های مهم جهانی تبدیل شده است. بر همین اساس در این پژوهش آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار انجام شد. در این مطالعه اثر فاکتورهای آزمایش شامل نیترات‌نقره در سه سطح (۰، ۱، ۲ میلی‌مولار) به‌عنوان عامل ایجاد تنش اکسیداتیو و دبکو (DABCO) به‌عنوان آنتی‌اکسیدان در سه سطح (۰، ۱۰، ۲۰ میلی‌مولار) روی رقم فلات و تجن گندم مورد بررسی قرار گرفت. صفات بیوشیمیایی مورد ارزیابی شامل شاخص سطح اکسیداسیونی سلول و محتوای کلروفیل بودند، همچنین ارزیابی بیان ژن‌های گلوکوناز و متالوتیونین به روش Real time qRT-PCR انجام شد. نتایج بررسی صفات میزان کلروفیل a و b نشان داد که با افزایش غلظت نیترات‌نقره، میزان این صفات کاهش قابل توجهی پیدا کردند. اعمال پیش‌تیمار دبکو قبل از محلول پاشی نیترات‌نقره منجر به افزایش در میزان این صفات به ویژه در غلظت ۱ میلی‌مولار نیترات‌نقره گردید. در شرایط تنش، بیان ژن متالوتیونین و گلوکاناز در سطوح پایین‌تر تنش افزایش یافت، اما با افزایش سطحوح بالاتر نیترات‌نقره، بیان این ژن‌ها کاهش یافتند. در هر دو رقم، سطح بالای بیان ژن‌های متالوتیونین و گلوکاناز در تیمار ۱ میلی‌مولار نیترات‌نقره بدون ترکیب با دبکو و کاهش بیان ژن در نیترات‌نقره ۲ میلی‌مولار مشاهده شد. اگرچه در این تحقیق به‌طور خاص تأثیر ترکیب دبکو بررسی نشد، اما اثر آنتی‌اکسیدان‌ها در کاهش تنش اکسیداتیو در گیاهان به‌طور عمومی شناخته شده است. با توجه به تأثیر مثبت دبکو بر کاهش اثرات تنش فلزی، پیشنهاد می‌شود در کشت‌های گندم از این ترکیب به‌عنوان یک روش مدیریتی بهره‌برداری شود. همچنین بررسی دقیق‌تر روی دیگر ژن‌های مرتبط با پاسخ به تنش اکسیداتیو می‌تواند به ما در درک بهتر سازوکارهای مقاومت گیاهان کمک کند. مطالعه شرایط بهینه برای استفاده از نیترات نقره و دبکو می‌تواند به افزایش تولید و بهبود کیفیت محصولات کشاورزی کمک کند.

واژگان کلیدی: گندم، تنش فلزی، گلوکاناز، متالوتیونین، کلروفیل

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: s.navabpour@gau.ac.ir

مقدمه

گندم یکی از مهمترین غالت و اساسیترین محصول غذایی در سراسر جهان محسوب می‌شود(Seifolahpour *et al*., 2024). به‌دلیل سازگاری بالا به شرایط محیطی مختلف و اهمیت آن در امنیت غذایی (غذای اصلی ٦٠ درصد از جمعیت جهان)، به‌طور وسیعی در سراسر جهان کشت می‌شود. تقاضا برای گندم نان در جهان با افزایش سریع رشد جمعیت در حال افزایش است (Hosseini *et al*., 2021). از این‌رو، میزان تولید این محصول چه از طریق افزایش سطح زیرکشت و چه از طریق افزایش در واحد سطح افزایش یافته است (Ji *et al*., 2017) همچنین شناخت سازوکار مولکولی رشد و توسعه گندم بخش عمده‌ای از پژوهش‌ها در حوزه ژنتیک مولکولی گیاهی را به خود اختصاص داده است (Asadzadeh and Abdollahi Mandoulakani, 2024). تنش‌های محیطی از عوامل اصلی کاهش دهنده رشد و نمو و عملکرد گیاهان زراعی به‌شمار آمده و همواره امنیت غذایی را تهدید می‌کنند. اگر تنش‌ها محیطی که به‌طور طبیعی یا به‌دست انسان به گیاه اعمال شوند، آن‌قدر وسیع باشند که روند متابولیسم گیاه را در مدت کوتاهی متوقف نمایند، ابتدا اکسیداسیون غیر قابل کنترل متوقف شده و سپس خسارات دیگر ناشی از تنش رخ می‌دهد. نقطه مشترک بیشتر تنش‌های زیستی و غیرزیستی در سطح سلولی تولید و تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species: ROS) است (Navabpour *et al*., 2020).

تنش اکسیداتیو در نتیجه عدم تعادل بین تولید مازاد ROS و یا کمبود آن در دفاع آنتی‌اکسیدانی درون‌زا و برون‌زا ایجاد می‌شود که این امر موجب تحریک مرگ سلولی از طریق اکسیداسیون ماکرومولکول‌هایی چون لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدنوکلئیک‌ها می‌شود (Ahn *et al*., 2006; Poblete Aro *et al*., 2015)، یا به‌صورت غیرمستقیم باعث تحریک غیرطبیعی و به هم‌خوردن تنظیم چرخه سلولی می‌گردد (Ahn *et al*., 2006). حضور ROS در غلظت‌های بالا و مدت زمان طولانی با وقوع اختلالات مختلفی همراه خواهد بود که با سازوکارهای متنوعی تظاهر پیدا می‌کنند (Poblete Aro *et al*., 2015). نیترات‌نقره به‌عنوان یک عامل تنش‌زا، اثرات سلولی مولکولی منفی روی گیاهان گذاشته که یکی از آن‌ها واکنش با دیواره سلولی و غشای سلولی است که منجر به تغییرات در نفوذپذیری غشاء، اختلال در نیروی حرکتی پروتون، مهار سنتز ATP، واکنش با اسید آمینه و مهار فعالیت آنزیم‌ها (از طریق اتصال با گروه‌های سولفیدریل (SH) اسید آمینه و جایگاه فعال آن‌ها)، مهار حرکت الکترون در چرخه تنفسی و سیتوکروم‌ها، به هم‌خوردن تنظیم سنتز DNA و RNA، تخریب ساختار ریبوزوم و مهار ساخت پروتئین و در نهایت تولید گونه‌های فعال اکسیژن است (Karimi *et al*., 2017). با ادامه افزایش تولید و غلظت ROS، آنزیم‌های مؤثر در مهار آن‌ها افزایش یافته و به تعدیل رادیکال‌های آزاد منجر می‌شوند. با استفاده از روش‌های ارزیابی بیان ژن از جمله Real time qRT-PCR می‌توان بیان ژن‌های مرتبط با تنش را برای مقابله با ROS رصد کرد (Karimi *et al*., 2017). در یک سلول ممکن است تعداد زیادی ژن درگیر در مکانیسم تحمل تنش، نظیر ژن‌های درگیر در حفاظت اسمزی، چاپرون‌ها، پروتئین‌های کانال آبی، پروتئازها، پروتئین‌های درگیر در پیام‌رسانی سلول، آنتی‌اکسیدان‌ها و غیره در طی تنش فعال شوند (Yamaguchi-Shinozaki *et al*., 2002).

در گیاهان ایزوفرم‌های متعددی از متالوتیونین‌ها وجود دارند که در بافت‌ها و مراحل رشدی مختلف گیاه و در اثر القاء عوامل مختلف بیان می‌شوند (Freisinger, 2007). همچنین این پروتئین‌ها قادر هستند با کلاته کردن یون‌های فلزی غیرضروری مانند نیترات‌نقره سلول را از آسیب غلظت‌های سمی این فلزات حفظ نمایند (Hassinen *et al*., 2011). از دیگر نقش‌های پیشنهادی برای متالوتیونین‌ها پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد و حفاظت سلول‌ها در برابر تنش اکسیداتیو است (Akashi *et al*., 2004). در تنش اکسیداتیو هنگامی که سطوح ROS در گیاه افزایش می‌یابد، فعالیت آنزیم‌های دفاعی و سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی هم در گیاه نیز افزایش خواهد یافت (Navabpour *et al*.,

2020). دبکو (DABCO) یک ترکیب آلی دو حلقه‌ای و یک کاتالیزور بسیار واکنش‌پذیر برای ساخت ترکیبات آلی است و به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان در خنثی‌سازی اثر رادیکال‌های آزاد نقش دارد (Navabpour *et al*., 2003). ژن‌های گلوکوناز نقشی کلیدی در متابولیسم قند و فرآیندهای انرژی‌زایی در گیاهان دارند، به ویژه در گیاهانی مثل گندم که به‌شدت به تأمین انرژی از منابع قندی وابسته‌اند. ژن‌های گلوکوناز مسئول هیدرولیز گلوکز-٦-فسفات به گلوکز آزاد هستند که می‌تواند به‌عنوان منبع انرژی مورد استفاده قرار گیرد. با تنظیم سطح قندها در بافت‌های گیاه، این ژن‌ها به همراه سایرآنزیم‌ها در کنترل غلظت قند نقش درند (Mohammadizadeh-Heydari *et al*., 2024). متالوتیونین‌ها به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی عمل می‌کنند و می‌توانند از آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد جلوگیری کنند که در هنگام تنش‌هایی مانند خشکی، شوری و تنش فلزات سنگین در گیاهان افزایش یابند. همچنین متالوتیونین‌ها می‌توانند با تعاملات خود با سایر پروتئین‌ها و ژن‌ها، به تقویت پاسخ‌های ایمنی گیاه کمک کنند (Konieczna *et al*., 2023). هدف این پژوهش بررسی میزان تنش اکسیداتیو و میزان دفاع آنتی‌اکسیدانی در مواجهه با آلودگی ناشی از نیترات نقره (AgNO3) است. در این مطالعه، واکنش هر یک از رقم‌های تجن و فلات به غلظت‌های مختلف این ترکیب و میزان دفاع آنها در برابر این تنش بررسی شد. به عبارتی، این تحقیق به تحلیل نحوه و سطح واکنش این ارقام گیاهی در برابر تنش ناشی از آلودگی می‌پردازد.

مواد و روش‌ها

آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. فاکتورهای آزمایش شامل نیترات‌نقره در سه سطح (۰، ۱ و ۲ میلی‌مولار) به‌عنوان عامل ایجاد تنش اکسیداتیو، دبکو به‌عنوان آنتی‌اکسیدان در سه سطح (۰، ۱۰ و ۲۰ میلی مولار) و فاکتور سوم شامل ارقام فلات و تجن گندم بودند. کاشت در گلخانه و در داخل گلدان‌هایی با گنجایش هفت کیلوگرم خاک صورت گرفت. در هر گلدان حدود ۳۰ بذر بعد از ضدعفونی، کشت گردیدند و بعد از رسیدن گیاهان به مرحله جوانه‌زنی و رشد اولیه به تعداد ۱۵ بوته در هر گلدان تنک شدند. تنش اکسیداتیو در مرحله ظهور سنبله با محلول‌پاشی نیترات‌نقره در غلظت‌های ۰، ۱ و ۲ میلی‌مولار صورت گرفت. همچنین به‌منظور بررسی نحوه افزایش میزان مقاومت به تنش اکسیداتیو تعداد دیگری از گلدان‌ها یک ساعت قبل از کاربرد نیترات‌نقره به‌طور جداگانه با غلظت‌های ۰، ۱۰ و ۲۰ میلی‌مولار دبکو به‌عنوان عامل پاک‌کننده اختصاصی یون اکسیژن منفرد محلول‌پاشی گردید. پس از رسیدن گیاهان به مرحله رشدی مورد نظر (ظهور سنبله)، برای اندازه‌گیری صفات بیوشیمیایی، ۵ بوته از هر تیمار و در سه تکرار نمونه‌برداری شد.

اندازه‌گیری صفات بیوشیمیایی: برای اندازه‌گیری محتوای کلروفیل از روش پورا و همکاران (Porra *et al*., 1989) استفاده گردید. به‌منظور اندازه‌گیری شاخص سطح اکسیداسیونی سلول از روش هاگگ و همکاران (Hagege *et al*., 1990) استفاده شد.

نمونه‌برداری جهت استخراج RNA: به‌منظور استخراج RNA، در مرحله خوشه‌دهی، ۰/۵ گرم از برگ گروه‌های تیماری مختلف نمونه‌برداری شد ودر فویل‌های استریل پیچیده و بلافاصله در ازت مایع فریز شدند و در نهایت به یخچال با دمای ۸۰- در آزمایشگاه ژنتیک گروه اصلاح‌نباتات و بیوتکنولوژی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل شدند.

استخراج RNA و ارزیابی بیان ژن: استخراج RNA با استفاده از بافر استخراج پی‌بایوزول شرکت بیوفلکس صورت گرفت. کیفیت RNA استخراج‌شده، توسط الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد تعیین گردید. سپس سنتز cDNA با استفاده روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز انجام و صحت cDNA سنتز شده به‌وسیله آغازگرهای ژن خانه‌دار *GAPDH* با استفاده از PCR، آزمون شد. جهت ارزیابی الگوی بیان ژن‌های گلوکوناز و متالوتیونین، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز کمی با استفاده از کیت سایبر بایوپارس (دانشگاه علوم کشاورزی ومنابع طبیعی گرگان، ایران) در دستگاه iQ۵ (شرکت بیورد، آمریکا) انجام شد. آغازگرهای ژن‌های منتخب، با استفاده از نرم‌افزار پرایمر ۳ با در نظر گرفتن خصوصیات مطلوب برای استفاده در

روش qRT-PCR طراحی شدند (جدول ۱). به‌منظور نرمال‌سازی داده‌ها از ژن خانه‌دار *GAPDH* شد و بیان نسبی ژن‌های مورد بررسی با در نظر گرفتن سه تکرار زیستی و دو تکرار فنی با استفاده از فرمول پیفاف (Pfaffl *et al*., 2002) محاسبه شد.

نتایج و بحث

تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۲) نشان داد که محلول‌پاشی نیترات‌نقره موجب افت بسیار معنی‌دار (α=٪۱) صفات کلروفیل a و b گردید. همچنین غلظت‌های دبکو نیز برای صفات تأثیر معنی‌داری داشت. اثر رقم نیز برای صفات کلروفیل مورد مطالعه در این تحقیق در سطح آماری یک درصد اختلاف معنی‌داری نشان داد. اثر متقابل نیترات‌نقره × دبکو هم تأثیر معنی‌داری از لحاظ آماری نشان داد. همچنین اثر متقابل نیترات‌نقره × رقم به جز کلروفیل a تأثیر معنی‌داری از لحاظ آماری در سطح یک درصد نشان داد. اثر متقابل رقم × دبکو به جزء کلروفیل b تأثیر معنی‌داری از لحاظ آماری نشان داد. و اثر متقابل سه جانبه نیترات‌نقره × دبکو × رقم تأثیر معنی‌داری از لحاظ آماری در سطح یک درصد نشان داد.

جدول ۱- نام، توالی، اندازه مورد انتظار محصول PCR و دمای آنیلینگ آغازگرهای مورد استفاده در آزمایش

Table 1. Name, sequence, expected PCR product size and annealing temparture of primers used in the experiment

نام آغازگر Primer name	توالی آغازگر Primer sequence	اندازه محصول (جفت‌باز) Product size (bp)	دمای آنیلینگ (سانتی‌گراد) Ta (ºC)	شماره دسترسی در NCBI NCBI accession number
Metallothion_F	5′-ACTGCAAGTGCAACCCCTGC-3'	155 bp	60	L 11879
Metallothion_R	5′-GCATAGGCGGAGAGCGAGCA-3'		57.9	
13glu-F	5′- GAGCTTCGGGCTCTTCAAC -3′	161 bp	57.89	Y18212
13glu-R	5′- CGTACGTGCCCGTTACACTT -3′		55	
GAPDH_F	5′-TCACCACCGACTACATGACC-3'	121 bp	60	EF 592180
GAPDH_R	5′-ACAGCAACCTCCTTCTCACC-3'		60	

جدول ۲- تجزیه واریانس برخی صفات مورد بررسی به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی

Table 2. Analysis of variance for a number of traits based on a factorial experiment laid out according to a randomized complete block design

منابع تغییرات Sources of changes	درجه آزادی df	میانگین مربعات صفات اندازه‌گیری شده The mean square of the measured traits		
		کلروفیل a Chlorophyll a	کلروفیل b Chlorophyll b	شاخص سطح اکسیداسیونی Oxidation level index
بلوک Block	2	0.748 ^{ns}	0.4 *	0.018 ^{ns}
نیترات‌نقره Silver nitrate	2	46.44**	27.04**	0.17**
دبکو Dabko	2	9.26**	14.10**	0.07*
رقم Cultivar	1	1.41**	3.37**	0.33**
نیترات‌نقره × دبکو Silver nitrate × DABCO	2	2.56**	2.76**	0.16**
نیترات‌نقره × رقم Silver nitrate × Cultivar	2	0.147 ^{ns}	1.02**	0.096**
دبکو × رقم Cultivar × DABCO	1	1.087*	0.095 ^{ns}	0.091*
نیترات‌نقره × دبکو × رقم Silver nitrate × DABCO × Cultivar	4	2.055**	1.092**	0.078*
خطا Error	34	0.25	0.11	0.02
ضریب‌تغییرات (درصد) CV (%)		5.183	3.63	21.12

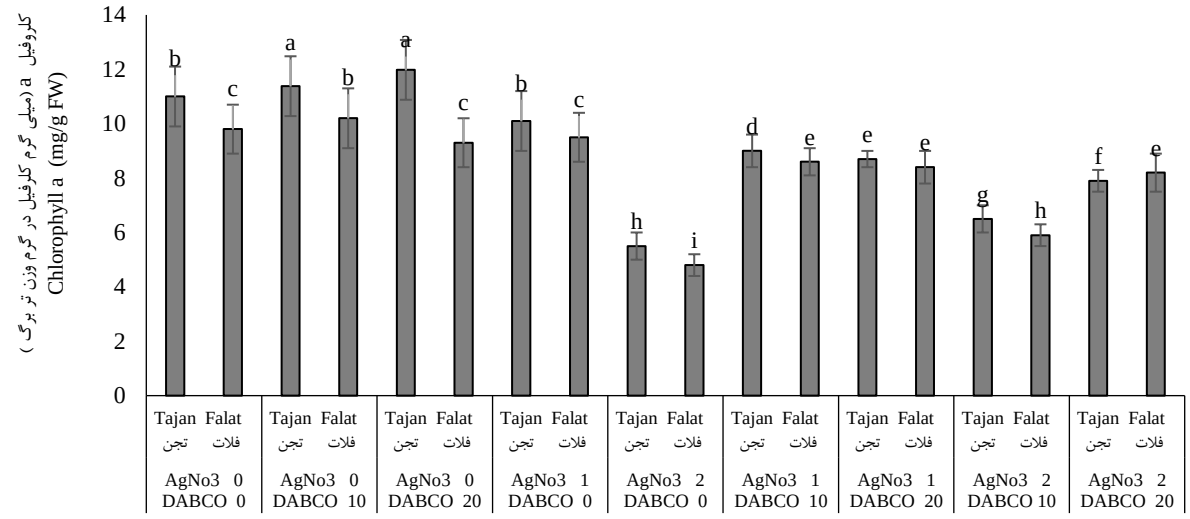
^{ns}، * و **: به‌ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطوح آماری ۵ و ۱ درصد.

^{ns}, * and **: Non-significant and significant at 5 and 1 percent statistical levels, respectively

کلروفیل a و b: غلظت کلروفیل‌های a و b در پاسخ به تیمارهای نیترات‌نقره کاهش معنی‌داری یافت (P <۰/۰۱). یکی از مهمترین اثرات فلزات سمی بر گیاهان، کاهش رنگیزه‌های فتوسنتزی برگ می‌باشد (Gerami *et al.*, 2018) موستاکاس و همکاران (Moustakas *et al.*, 1997) دریافتند که کاهش چشمگیر میزان کلروفیل در گیاهان تحت تنش فلزات سنگین نمایانگر وسعت آسیب‌های اکسیداتیو می‌باشد. تنش میزان کلروفیل a را کاهش می‌دهد از این‌رو کاهش کلروفیل در شرایط تنش می‌تواند به‌عنوان یک عامل محدودکننده به حساب آید (Ameer khan *et al.*, 2006). غلظت‌های بالای فلزات سنگین به‌دلیل تخریب و به هم ریختگی ساختار کارتنوئیدها، مقدار آن‌ها را در گیاه کاهش می‌دهد. کاهش کارتنوئیدها تحت تأثیر فلزات سنگین از علل دیگر افت کلروفیل ناشی از تنش اکسیداتیو ایجاد شده توسط عناصر سنگین محسوب می‌گردد، زیرا، کارتنوئیدها نقش حفاظت کلروفیل را بر عهده دارند (Ghorbanli *et al.*, 2012). روت و داس (Rout and Das, 2003) بیان نمودند که جایگزینی فلزات سنگین از جمله نیترات‌نقره به جای منیزیم اجازه باند شدن کلروفیل را به لیگاندهای مهم نمی‌دهد و در نتیجه ساختار فضایی مناسب کمپلکس کلروفیل–پروتئین ایجاد نمی‌شود. دلیل دیگر این که، کلروفیل تحریک شده، در حالت الکترونی بسیار ناپایدار می‌باشد و به سرعت به حالت آرامش می‌رسد. صالحی و همکاران (Salehi *et al.*, 2012) دریافتند که میزان کاهش کلروفیل برگ در دوران پیری برگ در تیمار دارای تنش سریع‌تر از تیمار شاهد بود. تغییرات کلروفیل برگ ممکن است به‌علت کاهش بیوسنتز (تهیه مواد شیمیایی به‌وسیله موجودات زنده) یا افزایش تخریب کلروفیل در شرایط تنش باشد (Amjad *et al.*, 2008). پارلاک (Parlak, 2016) 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.

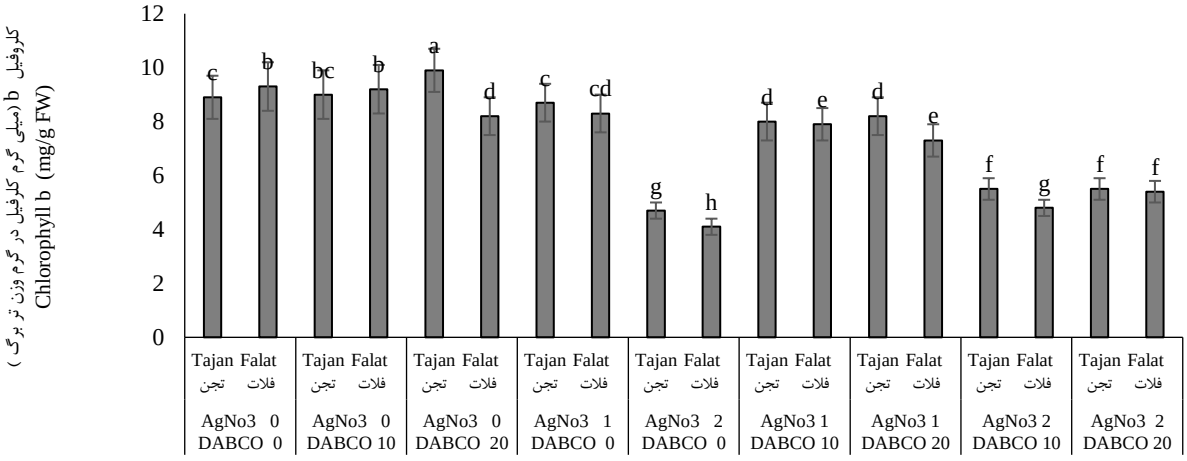
نتایج داده‌های این مطالعه نشان داد که در سطوح مختلف تیماری میزان کاهش کلروفیل b در مقایسه با کلروفیل a بیشتر بود. در مورد بخش نوری، فتوسیستم II نسبت به فتوسیستم I آسیب پذیرتر می‌باشد و چون میزان کلروفیل b بیشتری دارد، میزان کاهش کلروفیل b در شرایط تنش بیشتر است (Rout and Das, 2003). میزان اختلاف کلروفیل a وb با شاهد در غلظت ۲ میلی‌مولار بیشتر از میزان آن در تیمار ۱ میلی‌مولار نیترات‌نقره بود (شکل‌های ۱ و ۲). اعمال پیش‌تیمار دبکو ۲۰ میلی‌مولار قبل از محلول پاشی نیترات‌نقره سبب افزایش معنی‌دار در میزان کلروفیل‌های a و b گردید (شکل ۱ و ۲)، میزان این افزایش به‌ویژه در غلظت ۱ میلی‌مولار نیترات‌نقره به‌طور نسبی بیشتر بود. پایداری کلروفیل به‌عنوان شاخصی از مقاومت گیاه به تنش است. در گندم محتوای کلروفیل a با افزایش سطوح تنش کاهش یافت (Akter Hossani *et al.*, 2006). دبکو با کاهش سمیت نقره موجب افزایش میزان کلروفیل و حفظ سبزینگی و رشد گیاه خواهد شد. در واقع این آنتی‌اکسیدان به‌عنوان پاک کننده گونه‌های فعال اکسیژن عمل می‌کند؛ بنابراین افزایش میزان کلروفیل در اثر کاربرد دبکو مربوط به کاهش گونه‌های فعال اکسیژن به‌خصوص اکسیژن منفرد در اندام‌های گیاه تحت تنش فلزات سنگین می‌باشد (Saeidi-Sar *et al.*, 2005).

شاخص سطح اکسیداسیونی سلول (Thiobarbituric Acid Reactive Material: TBARM) و کلروفیل: در این سنجش که معیاری برای اندازه‌گیری میزان تنش اکسیداسیونی است مقدار اسیدتیوبار بی‌تیوریک که محصول نهایی و نسبتا پایدار واکنش اکسیداسیون مولکول‌های بزرگ حیاتی است، اندازه‌گیری شد. به‌طور کلی میزان TBARM به‌عنوان شاخص میزان نهایی اکسیداسیون سلول با افزایش سطوح تیمار (نیترات‌نقره) افزایش و در مقابل، عکس‌العمل میزان کلروفیل نسبت به افزایش سطوح تیمار منفی بود (شکل ٦ و ٧). اعمال تیمار اسپری دبکو به‌عنوان یک پاک‌کننده عمومی رادیکال‌های فعال اکسیژن ۲ ساعت قبل از تیمار اکسیداسیونی (نیترات‌نقره) در افزایش نسبت میزان کلروفیل و کاهش نسبی میزان TBARM تاثیر قابل‌توجهی دارد (۳ و ٤).



شکل ۱- تغییرات میزان کلروفیل a ناشی از اعمال تیمار $AgNo_3$ و پیش‌تیمار DABCO

Figure 1. Changes in the amount of chlorophyll a caused by AgNo3 treatment and DABCO pretreatment

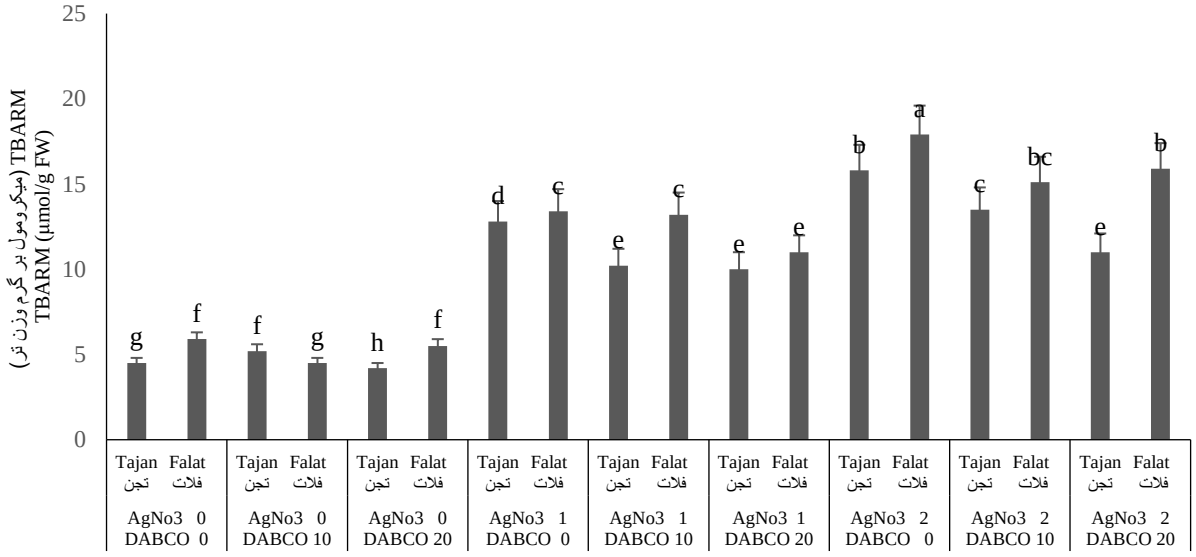


شکل ۲- تغییرات میزان کلروفیل b ناشی از اعمال تیمار $AgNo_3$ و پیش‌تیمار DABCO

Figure 2. Changes in the amount of chlorophyll b caused by AgNo3 treatment and DABCO pretreatment

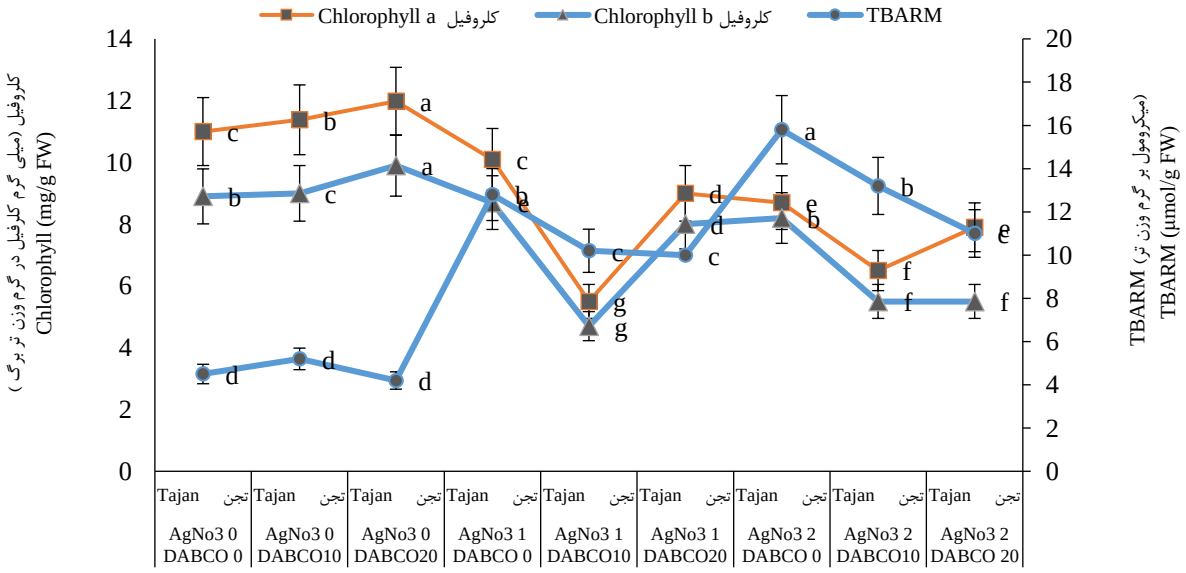
بیشترین افزایش TBARM در حداکثر مقدار تیمار اسپری نیترات‌نقره ۲ میلی‌مولار بدون پیش‌تیمار دبکو به‌دست آمد (شکل ٤). از طرفی کاهش نسبی میزان TBARM در تیمار مرکب دبکو+نیترات‌نقره در مقایسه با تیمار نیترات‌نقره مؤید تأثیر نیترات‌نقره از طریق افزایش رادیکال‌های فعال و تنش اکسیداسیونی است (شکل ٦ و ٧). کائور و همکاران (Kaur *et al.*, 2012) گزارش کردند که در گیاه گندم با افزایش غلظت سرب محتوای TBARM افزایش یافت که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت داشت. TBARM محصول پراکسیداسیون لیپیدها است که گیاهان تحت تنش قرار دارند و اغلب به‌عنوان شاخصی از میزان تنش اکسیداتیو مورداستفاده قرار می‌گیرد (Hu *et al.*, 2012). این امر را به فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نسبت می‌دهند تا سطح H_2O_2 را کاهش دهد و آسیب سلولی به غشاها را به حداقل برساند (Zhang *et al.*, 2008). غلظت TBARM ناشی از پراکسیداسیون لیپیدها دلالت بر ایجاد رادیکال‌های آزاد در بافت است. اگرچه

فرآیندهای تولید ROS در شرایط بهینه آهسته است، اما تنش سبب افزایش تولید آن‌ها می‌شود (Kaur *et al.*, 2012). بررسی تاثیر تنش کادمیم روی سورگوم توسط حسن و همکاران (Hassan *et al.*, 2020)، نشان داد که رشد به‌طور قابل‌توجهی کاهش و پراکسید هیدروژن و مالون دی آلدئید افزایش می‌یابد. در بررسی بهرامی و همکاران (Bahrami *et al.*, 2022) مشخص شد که با افزایش غلظت فلزات سنگین، میزان MDA در گندم در شرایط هیدروپونیک افزایش معنی‌دار پیدا می‌شود



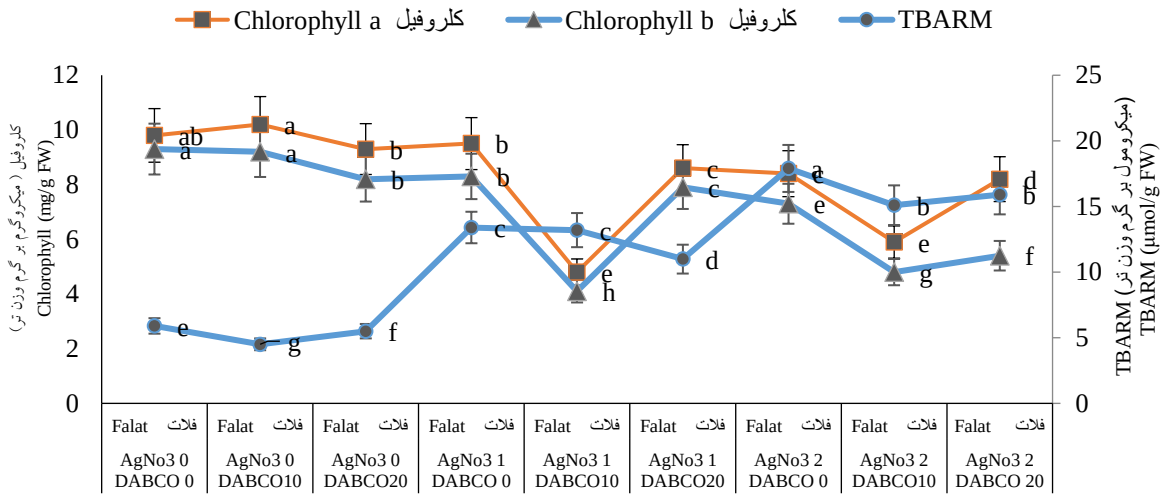
شکل ۳- میزان TBARM (میکرومول بر گرم وزن تر) تحت تیمار ترکیبی DABCO و $AgNO_3$.

Figure 3. The amount of TBARM (µmol/g FW) following combined DABCO and AgNO3 treatment.



شکل ٤- میزان TBARM (میکرومول بر گرم وزن تر) و کلروفیل برای تیمارهای $AgNO_3$ و تیمار ترکیبی $DABCO+AgNO_3$ در رقم تجن.

Figure 4. Amount of TBARM (µmol/g FW) and chlorophyll for AgNO3 treatments and combined DABCO+AgNO3 treatment in Tajan cultivar.



شکل ۵- میزان TBARM (میکرومول بر گرم وزن تر) و کلروفیل برای تیمارهای $AgNO_3$ و تیمار ترکیبی $DABCO+AgNO_3$ در رقم فلات

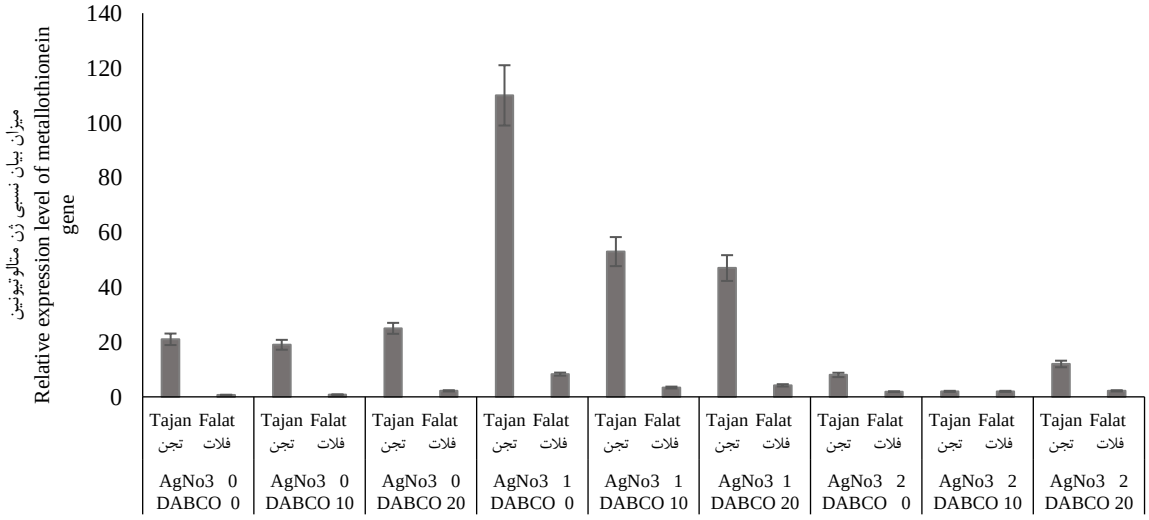
Figure 5. Amount of TBARM (µmol/g FW) and chlorophyll for AgNO3 treatments and combined DABCO+AgNO3 treatment in Palat variety.

نتایج حاصل از ارزیابی الگوی بیان ژن متالوتیونین: متالوتیونین یک پروتئین کوچک با ترکیب غیر معمول است، با تعداد کمی آمینو اسید آروماتیک و محتوای زیاد از دنباله‌های سیستئین که ظرفیت بالایی برای پیوند با فلز دارد (Sestakova *et al.*, 1999). این ژن یکی دیگر از ژن‌های بیان شونده طی تنش‌های گوناگون از جمله تنش فلزات است. نواحی پروموتوری متالوتیونین دارای عناصر مسئول واکنش به فلزات هستند که باعث افزایش تجمع متالوتیونین به‌علت تماس گیاه با فلزات سنگین می‌شود (Cobbett and Goldsbrough, 2002). به‌طور کلی براساس نتایج برخی آپژوهش‌ها، ژن متالوتیونین از ژن‌هایی است که تحت تأثیر رادیکال‌های فعال اکسیژن، افزایش نسبی بیان نشان می‌دهد (Navabpour *et al.*, 2003) و نقش مهمی در دفاع در مقابل تنش اکسیداتیو دارد. بیشترین میزان تولید رونوشت‌های ژن متالوتیونین در ارقام مورد مطالعه در سطح ۱ میلی‌مولار نیترات‌نقره بود. با افزایش میزان تنش اکسیداتیو در غلظت ۲ میلی‌مولار نیترات نقره، مقدار ROSی تولید شده در سلول افزایش و فعالیت این ژن در ارقام مورد بررسی کاهش ناگهانی و چشمگیری پیدا کرد (شکل ٦). این کاهش می‌تواند به‌دلیل تخریب ساختارهای تولید کننده متالوتیونین توسط رادیکال‌های سمی باشد. میزان بیان این ژن در رقم فلات نسبت به تجن از کاهش بالایی برخوردار بود. مقایسه تیمارهای نیترات‌نقره در غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌مولار نشان داد، که این ژن در غلظت پائین‌تر بیان نسبی بیشتری داشت. این موضوع با توجه به شدت عمل غلظت بالاتر $AgNO_3$ در بروز تنش اکسیداتیو و بروز مرگ سلولی دور از ذهن نیست. اگر مقدار ROS تولید شده بیش از حد آستانه باشد مکانیسم‌های مرگ برنامه‌ریزی شده سلول آغاز خواهد شد (Navabpour *et al.*, 2007) آنتی‌اکسیدان DABCO می‌تواند با انواع مختلف اکسیژن‌های فعال ترکیب شده و از بسیاری از آسیب‌های ناشی از افزایش ROS بکاهد (Janet *et al.*, 2002). در واقع دبکو به برقراری تعادل مناسب میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن کمک مؤثری می‌نماید.

نتایج حاصل از ارزیابی الگوی بیان ژن گلوکناز: β-۳-۱ گلوکناز یک آنزیم واسطه‌ای و تولید کننده سیگنال می‌باشد که در اثر تنش و تولید رادیکال‌ها بیان می‌شود (Cruz-Ortega *et al.*, 1997). دربسیاری از موارد تأثیر تنش‌های اکسیداتیو بدون اثر مستقیم بر توالی DNA و با تشدید فعالیت ژن‌ها و یا بیان ژن‌های خاموش صورت می‌گیرد (Habu *et al.*, 2001). بیشترین میزان افزایش بیان ژن گلوکناز در تیمار نیترات‌نقره ۱ میلی‌مولار حاصل گردید. درحالی‌که اسپری غلظت ۲

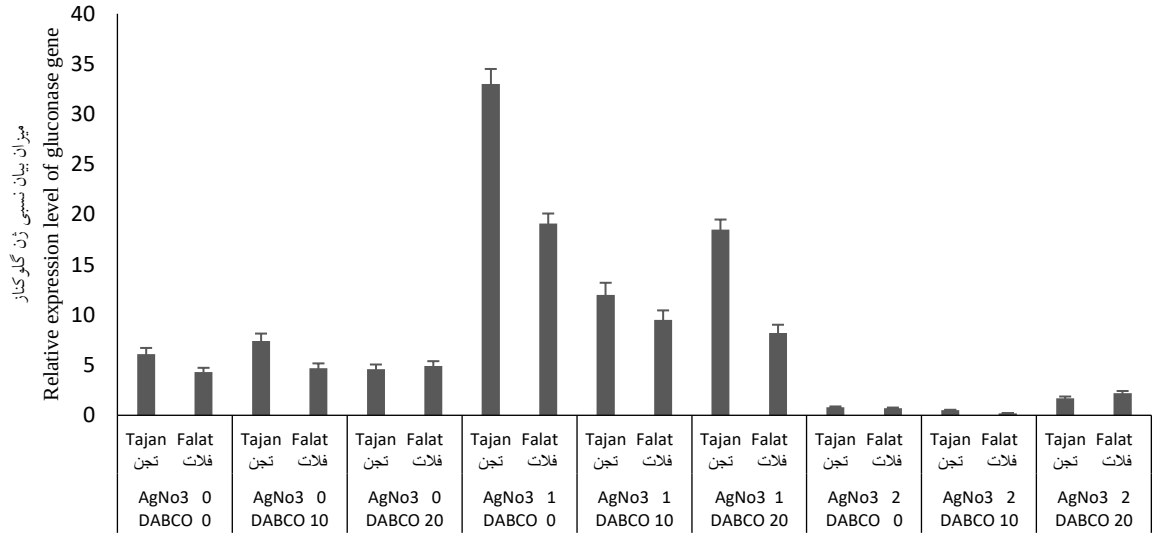
میلی‌مولار نیترات‌نقره سبب کاهش شدید بیان ژن گلوکناز گردید. این مسئله که در برخی مطالعات دیگر نیز گزارش شده است (Navabpour *et al*., 2003)، دور از انتظار نبود. به‌نظر می‌رسد با توجه به نقش اکسیداتیو نیترات‌نقره، کاربرد آن در غلظت‌های بالا موجب افزایش میزان مرگ سلولی گردیده و این مسئله موجب کاهش روند بیان ژن گلوکناز شده است. در حالی‌که غلظت پائین‌تر آن (۱ میلی‌مولار) می‌تواند با تحریک نسبی، سبب القای یک واکنش دفاعی در گیاه شده و در پی آن با افزایش میزان H_2O_2 فعالیت ژن گلوکناز تشدید گردد. نتایج مشابهی با اعمال سایر تیمارهای اکسیدانی گزارش شده است. در گندم ژن گلوکناز تحت تأثیر تنش فلز آلومینیوم القاء شده است و با افزایش تنش تا حد آستانه میزان بیان نیز افزایش پیدا کرد (Cruz-Ortega *et al*., 1997). بیان ژن گلوکناز تنها در غلظت ۱ میلی‌مولار نیترات‌نقره نسبت به شاهد افزایش نشان داد. این موضوع نشان می‌دهد که غلظت ۱ میلی‌مولار نیترات‌نقره باعث تحریک بیان ژن‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانت (گلوکناز) و القاء ROS جهت پیام‌رسانی برای دفاع در برابر آسیب‌های اکسیداتیو شده است. با افزایش تنش، کاهش در میزان بیان آن مشاهده شد (شکل ۷). نواب‌پور و همکاران (Navabpour *et al*., 2007) گزارش نمودند که میزان ROS در حد آستانه نقش پیام‌رسانی برای ایجاد پاسخ‌های دفاعی در سایر بخش‌های گیاه را دارند. این موضوع به‌دلیل تخریب آنزیم گلوکناز در شرایط تنش شدید بوده و می‌تواند منجر به بروز تنش اکسیداتیو در گندم گردد (Cruz-Ortega *et al*., 1997). از نتایج قابل توجه کاهش چشمگیر فعالیت ژن گلوکناز در تیمار ترکیبی دبکو به‌صورت پیش‌تیمار قبل از نیترات‌نقره در مقایسه با تیمار نقره به تنهایی در همان سطح بود. اثرات تنش توسط تجزیه کننده‌های رادیکال‌های آزاد اکسیژن مانند دبکو محدود می‌گردد (Percival and Dodag, 1991). به‌نظر می‌رسد اعمال پیش‌تیمار مزبور سبب کاهش قابل توجه رادیکال‌ها شده است و در نتیجه مقدار کمی پیام القائی برای افزایش بیان ژن حاصل شده است. لازم به ذکر است که عامل شیمیایی دبکو پاک کننده رادیکال اکسیدانی سوپراکسید است (Mackerras *et al*., 1995). کاهش فعالیت آنزیم گلوکناز نسبت به شاهد در سطوح تنش ۲ میلی‌مولار نیترات‌نقره در بیشترین مقدار خود بود (شکل ۷). این کاهش شدید می‌تواند به‌دلیل ممانعت در سنتز آنزیم یا تغییر در تجمع زیرواحدهای این آنزیم به واسطه تجمع مولکول‌های سمی پراکسیدهیدروژن باشد (Van and Clijsters, 1990).

با توجه به این‌که عامل شیمیایی دبکو پاک کننده اختصاصی یون سوپراکسید است به نظر می‌رسد ترکیب غلظت پائین‌تر نقره به همراه دبکو شرایط بهینه‌ای از وضعیت متعادل سطح رادیکال‌های اکسیژن را در جهت حداکثر تحریک و القای ژن‌های دفاعی فراهم آورده است (Navapour *et al*., 2003).



شکل ٦- تغییرات میزان بیان ژن متالوتیونین ناشی از اعمال تیمار $AgNO_3$ و DABCO در ارقام تجن و فلات

Figure 6. Changes in metallothionein gene expression due to AgNO3 and DABCO treatment in Tajan and Falat cultivars



شکل ۷- تغییرات میزان بیان ژن گلوکناز ناشی از اعمال تیمار $AgNO_3$ و DABCO در ارقام تجن و فلات

Figure 7. Changes in the expression level of glucanase gene due to AgNO3 and DABCO treatments in Tajan and Falat cultivars

در این مطالعه در غلظت ۱ میلی‌مولار نیترات‌نقره میزان بیان ژن گلوکناز و متالوتیونین بدون هیچ پیش‌تیمار، بیشترین مقدار بود. با افزایش میزان تنش اکسیداتیو ناشی از اعمال نیترات‌نقره (۲ میلی‌مولار) میزان فعالیت ژن‌های گلوکناز و متالوتیونین کاهش یافت. میزان بیان ژن‌ها در هر دو رقم دارای روندی همسو بودند در حالی که مقدارشان متفاوت بود. کمترین میزان بیان ژن در غلظت ۲ میلی‌مولار نیترات‌نقره بدون هیچ پیش‌تیماری بود. عامل شیمیایی دبکو پاک‌کننده اختصاصی یون سوپراکسید است و به نظر می‌رسد ترکیب غلظت پائین‌تر نیترات‌نقره به همراه دبکو شرایط بهینه‌ای از وضعیت متعادل سطح رایکال‌های اکسیژن را در جهت حداکثر تحریک و القای ژن‌های مورد مطالعه فراهم آورده است. بررسی صفات کلروفیل a و b نشان داد که با افزایش غلظت نیترات‌نقره میزان این صفات کاهش قابل‌توجه‌ای یافته بود. اعمال پیش‌تیمار دبکو قبل از محلول پاشی نیترات‌نقره منجر به افزایش در میزان این صفات به ویژه در غلظت ۱ میلی‌مولار نیترات‌نقره گردید. کاهش کلروفیل برگ با افزایش میزان تنش اکسیداتیو ممکن است به‌علت کاهش بیوسنتز و یا افزایش تخریب کلروفیل به واسطه افزایش فعالیت آنزیم کلروفیلاز باشد. میزان اختلاف کلروفیل a و b با شاهد در غلظت ۲ میلی‌مولار بیشتر از میزان آن در تیمار ۱ میلی‌مولار بود. دبکو سبب کاهش میزان خسارات ناشی از تنش اکسیداتیو گردید. میزان کلروفیل با اعمال پیش‌تیمار دبکو در تیمارهای ترکیبی ۱ میلی‌مولار نیترات‌نقره به‌طور معنی‌داری نسبت به تیمارهای ترکیبی ۲ میلی‌مولار نیترات‌نقره افزایش یافت. شاخص پایداری بالای کلروفیل به معنی عدم تأثیر یا تأثیر کم تنش بر گیاه می‌باشد که در نهایت موجب استفاده‌ی بهینه گیاه از کلروفیل می‌گردد. از طرفی اعمال تیمار اسپری دبکو به‌عنوان یک پاک‌کننده عمومی رادیکال‌های فعال اکسیژن ۲ ساعت قبل از تیمار اکسیداسیونی (نیترات‌نقره) در افزایش نسبت میزان کلروفیل و کاهش نسبی میزان TBARM تاثیر قابل‌توجهی دارد. به‌طور کلی، شاخص‌های زیادی برای اندازه‌گیری خسارت ناشی از تنش بر گیاهان معرفی گردیده که شاخص‌های فیزیولوژیکی، آنزیمی و مولکولی از جمله مهم‌ترین این شاخص‌ها می‌باشند. اندازه‌گیری این شاخص‌ها عموماً وقت‌گیر و پرهزینه است، بر این اساس ردیابی معیارهای آسان و کم‌هزینه قابل توصیه می‌باشد که از آن جمله میزان کلروفیل قابل اعتمادی تلقی می‌گردد. از طرفی در عرصه مولکولی بررسی میزان فعالیت ژن‌های القا کننده مقاومت به تنش فلزات واجد اهمیت زیادی می‌باشد.

References

Ahn, J., Ambrosone, C.B., Kanetsky, P.A., Tian, C., Lehman, T.A., Kropp, S., Helmbold, I., Von Fournier, D., Haase, W., Sautter-Bihl, M.L., Wenz, F. and Chang-Claude, J. (2006). Polymorphisms in genes related to oxidative stress (CAT, MnSOD, MPO and eNOS) and acute toxicities from radiation therapy following lumpectomy for breast cancer. *Clinical Cancer Research*, **12(23):** 7063-7070.

Akashi, K., Nishimura, N., Ishida, Y. and Yokota, A. (2004). Potent hydroxyl radical-scavenging activity of drought-induced type-2 metallothionein in wild watermelon. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **323**: 72-78.

Akter Hossani, A., Halim, M.A., Hossain, F. and Meher Niger, M.A. (2006). Effect of NaCl salinity on some physiological characters of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Bangladesh Journal of Botany*. **35:** 9-15.

Ameer Khan, S.A., Habib-Ur-Rehman, A. and Ashraf, M. (2006). Interactive effect of foliarly applied ascorbic asid and salt stress on wheat at the seedling stage. *Pakistan Journal of Botany*, **38(5):** 1407-1414.

Amjad, H., Shazia, N., Tahira, I., Hina, S. and Ahsanul, M. (2008). Effects of NaCl salinity on seedling growth, senescence, catalase and protease activities in two wheat genotypes differing in salt tolerance. *Pakistan Journal of Botany*, **40(3):** 1043-1051.

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 Researches*, **11(1):** 1-14 (In Persian).

Bahrami, A., Khorasani, R. and Taheri, M. (2022) The effect of silicon in reducing oxidative damage caused by cadmium toxicity in wheat in hydroponic conditions. *Plant Process and Function*, **10(41):**129-143.

Cobbett, C. and Goldsbrough, P. (2002). Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology*, **53(1):** 159-182.

Cruz-Ortega, R., Cushman, J.C. and Ownby, J.D. (1997). cDNA clones encoding 1, 3-β-glucanase and a fimbrin-like cytoskeletal protein are induced by Al toxicity in wheat roots. *Plant Physiology*, **114(4):** 1453-1460.

Freisinger, E. (2007). Spectroscopic characterization of a fruit specific metallothionein *M.acuminata* MT3. *Inorganica Chimica Acta*, **360**: 369-380.

Gerami, M., Ghorbani, A. and Karimi, S. (2018). Role of salicylic acid pretreatment in alleviating cadmium-induced toxicity in *Salvia officinalis* L. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*, **10(1):** 81-96 (In Persian).

Ghorbanli, M., Meighani, F. and Asadollahi, B. (2012). Role of mineral ions and proline in copper stress tolerance in two canola (*Brassica napus* L.) cultivars. *Journal of Science Kharazmi University*, **9(4):** 593-602 (In Persian).

Habu, Y., Kakutani, T. and Paszkowski, J. (2001). Epigenetic developmental mechanisms in plants: molecules and targets of plant epigenetic regulation. *Current Opinion in Genetics & Development*, **11:** 215-220.

Hagege, D., Nouvelot, A., Boucard, J. and Gaspar, T. (1990). Malondialdehyde titration with thiobarbiturate in plant extracts: avoidance of stress condition. *Journal of Plant Molecular Breeding*, **1(2):** 58-64.

Hassan, M.J., Raza, M.A., Ur Rehman, S., Ansar, M., Gitari, H., Khan, I., Wajid, M., Ahmed, M., Shah, G.A., Peng, Y. and Li, Z. (2020). Effect of cadmium toxicity on growth, oxidative damage, antioxidant defense system and cadmium accumulation in two sorghum cultivars. *Plants*, **9:** 1575-1588.

Hassinen, V., Tervahauta, A.I., Schat, H. and Karenlampi, S. (2011). Plant metallothioneins – metal chelators with ROS scavenging activity. *Plant Biology*, **13:** 225-232.

Hosseini, M., Saidi, A., Maali-Amiri, R., Abbasi, A. and Khosravi-Nejad, F. (2021). Developmental regulation and metabolic changes of RILs of crosses between spring and winter wheat during low temperature acclimation. *Environmental and Experimental Botany*, **182:**104-299.

Hu, R., Sun, K., Su, X., Pan, Y.X., Zhang, Y.F. and Wang, X.P. (2012). Physiological responses and tolerance mechanisms to Pb in two xerophils: *Salsola passerina* Bunge and *Chenopodium album* L. *Journal of Hazardous Materials*, **205:** 131-138.

Janet, R., Sparrow, Zhou, J., Ben-Shabat, B., Vollmer, H., Itagaki, Y. and Nakanishi, K. (2002). Involvement of oxidative mechanisms in blue-light–induced damage to A2E-Laden RPE. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **43:**1222-1227.

Ji, H., Xiao, L., Xia, Y., Song, H., Liu, B., Tang, L., Cao, W., Zhu, Y. and Liu, L. (2017). Effects of jointing and booting low temperature stresses on grain yield and yield components in wheat. *Agricultural and Forest Meteorology*, **243:** 33-42.

Karimi, J., Mohsenzadeh, S., Niazi, A. and Moghadam, A. (2017). Diffrential expression of mitochondrial manganese superoxide dismutase (SOD) in *Triticum aestivum* exposed to silver nitrate and silver nanoparticles. *Iranian Journal of Biotechnology*, **15(4):** 284-288.

Kaur, G., Singh, H.P., Batish, D.R. and 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.

Konieczna, W., Mierek-Adamska, A., Chojnacka, N., Antoszewski, M., Szydłowska-Czerniak, A. and Dąbrowska, G.B. (2023). Characterization of the metallothionein gene family in *Avena sativa* L. and the gene expression during seed germination and heavy metal stress. *Antioxidants*, **12(10):** 1865.

Mackerras, D. (1995). Antioxidant health. fruits and vegetables of supplements? *Food Australia*, **47:** 3-23.

Mohammadizadeh-Heydari, N., Tohidfar, M., Maleki Zanjani, B., Mohsenpour, M., Ghanbari Moheb Seraj, R. and Esmaeilzadeh-Salestani, K. (2024). Co-overexpression of chitinase and β-1, 3-glucanase significantly enhanced the resistance of Iranian wheat cultivars to Fusarium. *BMC Biotechnology*, **24(1):** 35.

Moustakas, M., Eleftheriou, E.P. and Ouzounidou, G. (1997). Short- term effects of aluminum at alkaline pH on the structure and function of the photosynthetic apparatus. *Photosynthetica*, **34:** 169-177.

Navabpour, S., Bagherieh-Naggar, M.B. and Soltanloo, H. (2007). Identification of novel genes expressed in Brassica napus during leaf senescence and in response to oxidative stress. *International Journal of Plant Prodaction*, **1:** 35-44.

Navabpour, S., Morris, K., Allen, R., Harrison, E., Mackerness, S. and Buchanan-Wollaston, V. (2003). Expression of senescence-enhanced genes in response to oxidative stress. *Journal of Experimental Botany*, **54:** 2285-2292.

Navabpour, S., Yamchi, A., Bagherikia, S. and Kafi, H. (2020). Lead-induced oxidative stress and role of antioxidant defense in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Physiology and Molecular Biology of Plants*, **26(4):** 793-802.

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.

Percival, M.P. and Dodag, A.D. (1991). Photodynamic Effects of Rose-Bengalon senescent Flax Cotyledons. *Journal of Experimental Botany*, **34:** 47-54.

Pfaffl, M.W., Horgan, G.W. and 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.

Poblete Aro, C.E., Russell Guzman, J.A., SotoMunoz, M.E. and Villegas Gonzalez, B.E.(2015). Effect of high intensity interval training versus moderate intensity continuous training on the reduction of oxidative stress in type 2 diabetic adult patients: CAT. *Medwave*, **15(7):** e6212.

Porra, R.J., Thompson, W.A. and 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(3):** 384-394.

Rout, G.R. and Das, P. (2003). Effect of metaltoxicity on plant growth and metabolism. *Agronomy Journal*, **23:** 3-11.

Saeidi-Sar, S., Fahimi, H., Khavari-Nejad, R.A., Majd, A. and Ghorbanli, M. (2005). Amelioration of nickel toxicity in soybean plants by gibberellin and ascorbic acid. *Rostaniha*, **6(1):** 67-76 (In Persian).

Salehi, M., Kochaki, A. and Nasiri Mahalati, M. (2012). Leaf nitrogen and SPAD reading as indicator for drought stress in wheat. *Iranian Journal of Field Crops Research*, **1(2):** 205-199.

Seifolahpour, B., Bahraminejad, S., Cheghamirza, K. and Sasani, S. (2024). Estimation of genetic parameters related to grain quality characteristics in inbred lines derived from two bread wheat cultivars. *Plant Genetic Researches*, **11(1):** 137-150 (In Persian).

Sestakova, I., Mader, P., Vodickova, H. and Pacakova, V. (1999). Voltammetric Methods In Isolation and Identification of Plant Metallothioneins from Alga Chlorella. Birkhauser Verlag Basel/Switzerland. In: Klaassen, C.D., Ed. *Metallothionein IV*. pp. 111-123. Birkhäuser Basel, Basel, Switzerland.

Van, F. and Clijsters, H. (1990). Biotechnology for the production of secondary metabolites. *Plant, Cell & Environment*, **13:** 195-206.

Yamaguchi-Shinozaki, K., Kasuga, M., Liu, Q., Nakashima, K., Sakuma, Y., Abe, K., Shinvari, Z., Seki, M. and Shinozaki, M. (2002). Biological mechanisms of drought stress response. *JIRCAS Working Report*, **23:** 1-8.

Zhang, C., Luo, L., Xu, W. and 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.