



## بررسی بیان ژن‌های پاداکسیدان و برخی صفات بیوشیمیایی گندم نان تحت تنش فلز جیوه

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

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشگاه منابع طبیعی و علوم کشاورزی گرگان

۲. دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشگاه منابع طبیعی و علوم کشاورزی گرگان

۳. استادیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشگاه منابع طبیعی و علوم کشاورزی گرگان

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۸/۰۶؛ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۰/۱۶

### چکیده

جیوه به‌عنوان یک عنصر فلزی سنگین، در آلودگی محیط و ایجاد سمیت و تنش در موجودات زنده نقش دارد. جیوه با تجمع در خاک و جذب به‌وسیله گیاه به زنجیره غذایی وارد می‌شود و مسمومیت‌هایی را در گیاهان و افراد تغذیه‌کننده به وجود می‌آورد. بر این اساس آزمایشی به‌صورت اسپیلت پلات در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی به‌صورت کشت هیدروپونیک انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل کلرید جیوه با غلظت‌های (صفر به‌عنوان شاهد، ۵، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار) به‌عنوان فاکتور اصلی و ژنوتیپ‌های گندم نان (مرورید، گنبد و لاین N9108) به‌عنوان فاکتور فرعی بود. نتایج نشان داد در ژنوتیپ‌های مرورید و N9108 با تیمار کلرید جیوه میزان بیان ژن کاتالاز و متالوتیونین افزایش یافت و بیشترین میزان بیان این ژن‌ها تحت تیمار ۱۵ میکرومولار کلرید جیوه (به ترتیب ۹/۲ و ۲/۷ برابر نسبت به شاهد) بود. با افزایش غلظت کلرید جیوه کاهش معنی‌داری در میزان کلروفیل ژنوتیپ‌های مختلف مشاهده شد. به‌علاوه کلرید جیوه به‌طور معنی‌داری میزان شاخص اکسیداسیون سلولی را در گیاهچه‌های تیمار شده در مقایسه با شاهد افزایش داد. می‌توان نتیجه گرفت رقم مرورید و لاین امیدبخش N9108 تحت تنش کلرید جیوه، واکنش بهتری نسبت به رقم گنبد از خود نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: کاتالاز، کشت هیدروپونیک، کلرید جیوه، گندم، متالوتیونین، مرحله گیاهچه‌ای

### مقدمه

سنگین پس از ورود به بدن از بدن دفع نشده و در بافت‌های بدن انباشته می‌گردند. همین امر موجب بروز بیماری‌ها و عوارض متعددی در بدن می‌شود (Islam et al., 2007).

جیوه به‌عنوان یکی از فلزات سمی با تجمع در دیواره سلولی و ورود به سیتوپلاسم سبب تنش اکسیداتیو شده که به دنبال آن گونه‌های فعال اکسیژن واکنش‌گر را در گیاهان تولید می‌شود. این فرآیند سبب آسیب در ساختار لیبیدهای غشایی شده و متابولیسم سلولی را دچار اختلال می‌کند، این عنصر همچنین فعالیت میتوکندری‌ها را متوقف می‌سازد (Zhou et al., 2007). سمیت جیوه در اثر افزایش این عنصر در محیط رشد گیاه، باعث کاهش پتانسیل آبی، اختلال در تغذیه گیاه، تغییر در تراوی غشای سلولی، توقف رشد ریشه

بشر تمام غذای خود را به شکل مستقیم و غیرمستقیم از گیاهان به دست می‌آورد، جنس‌های مختلف غلات که از خانواده گرامینه می‌باشند تقریباً نصف کالری و قسمت زیادی از نیازهای غذایی انسان را تأمین می‌نمایند (Irannezhad and Shahbaziyan, 2005). تنش‌های غیرزیستی از جمله فلزات سنگین باعث ایجاد خسارات زیادی به گندم می‌شوند. صنعتی شدن جوامع باعث آزادسازی ترکیبات سمی زیادی در بیوسفر شده است. از میان فلزات سنگین، جیوه به‌عنوان سمی‌ترین فلز در محیط، در نظر گرفته می‌شود. این فلز از عمده‌ترین آلاینده‌های محیطی محسوب می‌شود که سمیت آن به دلایل اکولوژیک، تکاملی، تغذیه‌ای و محیطی مشکل بزرگی به شمار می‌رود (Amani, 2008). در واقع فلزات

سم‌زدایی فلزات سنگین است. متالوتیونین‌ها به دلیل قابلیت بالای اتصال فلز می‌توانند کاتیون‌های دو ظرفیتی به‌ویژه روی و مس موردنیاز برای متالوآنزیم‌ها و فاکتورهای رونویسی را تأمین کنند (Blindauer et al., 2008). همچنین این پروتئین‌ها قادر هستند با کلاته کردن یون‌های فلزی غیرضروری مانند جیوه سلول را از آسیب غلظت‌های سمی این فلزات حفظ نماید (Hassinen et al., 2011). از دیگر نقش‌های پیشنهادی برای متالوتیونین‌ها پاک‌سازی رادیکال‌های اکسیژنی و حفاظت سلول‌ها در برابر تنش اکسیداسیون است (Akashi et al., 2004).

در همین راستا این تحقیق به‌منظور ارزیابی الگوی بیان ژن‌های کاتالاز و متالوتیونین و همچنین اندازه‌گیری شاخص‌های بیوشیمیایی که به‌عنوان شاخص‌های تحمل به تنش شناخته می‌شوند در سه ژنوتیپ گندم (مرورید، گنبد و لاین N9108) جهت بررسی تحمل آن‌ها نسبت به سمیت فلز جیوه انجام شد.

#### مواد و روش‌ها

این آزمایش به‌صورت اسپلیت پلات در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار در آزمایشگاه اصلاح نباتات دانشکده تولید گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان اجرا شد. بذور ژنوتیپ‌های مورد آزمایش به مدت ۴ دقیقه در محلول هیپوکلرید سدیم یک درصد ضدعفونی و به‌طور کامل با آب دیونیزه شست‌وشو و در پتری دیش قرار گرفتند. بذور در دمای ۲۰ درجه و در شرایط تاریکی طی مدت ۵ روز در انکوباتور جوانه‌دار شدند و ۲۰ بذر جوانه‌دار شده یکنواخت از هر ژنوتیپ به تشت‌های مخصوص پرورش هیدروپونیک (به ابعاد ۲۷×۴۵) حاوی ۷ لیتر محلول هوگلند منتقل گردید و با فاصله ۲ سانتی‌متر از یکدیگر قرار داده شد (شکل ۱). تیمارهای آزمایشی شامل کلرید جیوه با غلظت‌های (صفر (تیمار شاهد)، ۵، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار) به‌عنوان فاکتور اصلی و ژنوتیپ‌های گندم نان (مرورید، گنبد و N9108) به‌عنوان فاکتور فرعی بود که برای هر واحد آزمایشی (یک تشت) در نظر گرفته شد. در این حالت برای هر سطح تنش از تمامی ژنوتیپ‌ها در هر تشت نمونه موجود بود.

ارقام مرورید و گنبد بیشترین سطح کشت را در منطقه دارند و لاین N9108 از لاین‌های امیدبخش می‌باشند که داری عملکرد بالا بوده و نسبت به تنش‌های خشکی و شوری متحمل می‌باشند. با رسیدن گیاهان به مرحله پنجه‌زنی (۱۰

و ساقه و کاهش در تولید پروتئین و جوانه‌زنی می‌گردد (Zhao et al., 2008). حد مجاز جیوه در خاک ۲ میکروگرم و برای رشد گیاهان ۰/۱ تا ۰/۵ میکروگرم ذکر شده است (Solhi et al., 2005).

تجمع گونه‌های فعال اکسیژن در سلول منجر به فعال کردن مسیرهای 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 (Salehi et al., 2014). گیاهان دارای مجموعه‌ای از سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانتهی متشکل از اجزای آنزیمی و غیر آنزیمی هستند. اجزای آنزیمی سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانتهی شامل چند آنتی‌اکسیدانت آنزیمی مانند سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) و گایاکول پراکسیداز (GPX) و کاتالاز (CAT) و آسکوربیت پراکسیداز هستند (Sharma et al., 2012). کاتالاز یک آنزیم محتوی هم است که تبدیل دو مولکول پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن را کاتالیز می‌کند (Foyer et al., 1994). حذف مقادیر اضافی گونه‌های فعال اکسیژن و دخالت در تنظیم سلولی به عهده دو آنزیم کاتالاز و پراکسیداز است که کاتالاز در این زمینه نقش مؤثرتری را ایفا می‌کند. یک مولکول کاتالاز در هر ثانیه می‌تواند میلیون‌ها مولکول پراکسید هیدروژن را به آب و اکسیژن تبدیل کند (Chelikani et al., 2004). از آنجایی که کاتالاز به حفظ هموستازی اکسیژن فعال در زمان تنش‌های زنده و غیرزنده کمک می‌کند، بنابراین فعالیت آن نیز در گیاه به هنگام تنش بیشتر می‌شود (Magbanua et al., 2007). در گیاهان ژن CAT2 در شرایط غیر تنش نسبت به ژن‌های CAT1 و CAT3 بیشتر بیان می‌گردد. CAT1 و CAT2 نقش مهمی در سازگاری گیاه در برابر تنش‌های محیطی دارد و CAT1 برای تنظیم سیگنال‌های گونه‌های فعال اکسیژن از اهمیت بیشتری برخوردار است (Du et al., 2008).

کلاته کننده‌های درون سلولی و غنی از آمینواسیدهای سیستمین از جمله متالوتیونین‌ها نقش مهمی در پاسخ به تنش ایفا می‌کنند (Cobbett 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 et al., 2007). نقش دقیق زیستی این پروتئین‌ها هنوز مورد بحث است. یکی از نقش‌های پیشنهادی برای این پروتئین‌ها هموستازی و

صورت گرفت (Cailin et al., 2008). برای تهیه محلول کلرید جیوه در غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار با توجه به جرم مولکولی کلرید جیوه که ۲۷۱/۵ گرم بود از محاسبات زیر استفاده شد. کلرید جیوه در آب مقطر حل شد و به دلیل توزین سخت هزارم گرم با ترازوی آزمایشگاه محلول استوک 100 x تهیه شد. از استوک ۱۰ میلی‌لیتر برداشته و با آب مقطر به حجم یک لیتر رسانده شد.



روز پس از کشت در محیط هیدروپونیک)، محلول کلرید جیوه در غلظت‌های ذکرشده به محیط کشت محلول هوگلند برای هر تیمار اضافه شد و تنش اعمال گردید. pH محلول غذایی بین ۵ تا ۵/۸ تنظیم شد. دمای محیط نگهداری طی روز ۲۵ و در شب ۱۸ درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید و طول دوره روشنایی ۱۶ ساعت با شدت نور ۲۵۰-۳۰۰ میکرومول بر مترمربع در ثانیه و ۸ ساعت تاریکی بود. مقدار رطوبت محیط ۶۰ تا ۶۵ درصد و هوادهی ریشه‌ها نیز به‌وسیله پمپ هوادهی



شکل ۱. گیاهچه‌های گندم کشت‌شده در محیط کشت هوگلند

Fig.1. Wheat seedlings cultivated in Hoagland culture media

NCBI و با استفاده از نرم‌افزار پرایمر ۳ و در نظر گرفتن خصوصیات مطلوب برای استفاده در روش QRT-PCR طراحی شدند. از آنجایی که طول توالی محصولات بین ۱۳۲ و ۱۸۷ باز بود، دمای نقطه ذوب بین ۵۱/۴ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد، با توجه به درصد GC و طول باندها انتخاب شد. اطلاعات مربوط به آغازگرها در جدول شماره ۱ آورده شده است. در پایان واکنش و پس از دریافت نمودار منحنی ذوب (شکل ۲)، اطلاعات به نرم‌افزار REST منتقل شده و تجزیه داده‌ها انجام گرفت (Moloudi et al., 2013).

در ادامه برخی صفات مانند میزان کلروفیل a و b و شاخص اکسیداسیون سلولی مورداندازه‌گیری قرار گرفت. برای استخراج کلروفیل ۰/۵ گرم از بافت برگ یخ‌زده با ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد مخلوط شده و به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. سپس با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر WAP مدل UV/vis2000S، در طول موج‌های ۶۴۳ و ۶۴۵ نانومتر جذب محلول اندازه‌گیری شد و میزان کلروفیل a و b از فرمول‌های زیر محاسبه گردید:

$$\text{Chl. a (mgml}^{-1}\text{)} = 12.25A_{663.6} - 2.55A_{646.6} \quad [1]$$

$$\text{Chl. b (mgml}^{-1}\text{)} = 20.31A_{646.6} - 4.91A_{663.6} \quad [2]$$

گیاهچه‌ها به مدت ۱۰ روز در تیمار مذکور نگهداری و سپس از برگ‌های جوان و بالغ در ابتدای مرحله ساقه‌دهی نمونه‌گیری شد و بلافاصله در نیتروژن مایع غوطه‌ور شدند. نمونه‌های برگ‌گی تا زمان اندازه‌گیری متغیرها در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج RNA با استفاده از بافر استخراج پی باپوزول شرکت بیوفلکس (توکیو، ژاپن) صورت گرفت. کیفیت RNA استخراج‌شده، توسط الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد تعیین گردید. سپس سنتز cdNA با روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز صورت گرفت و به‌وسیله آغازگرهای ژن خانه‌دار GAPDH با استفاده از PCR، cdNA سنتز شده آزمون گردید (Kazemi et al., 2010). جهت ارزیابی الگوی تظاهر ژن‌های کاتالاز و متالوتیونین از دستگاه IQ5 شرکت Bio Rad و کیت سایبر بیوپارس (دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان) که قادر است ارزیابی را در زمان واقعی انجام دهد استفاده شد.

به‌منظور نرمال‌سازی داده‌ها از ژن خانه‌دار GAPDH که دارای بیان یکسانی در تمام تیمارها است استفاده شد. آغازگرهای موردنیاز بر اساس اطلاعات موجود در سایت

درصد وزن به حجم) و یک میلی لیتر اسید تیوباربیورنیک (w/v 6/0 درصد) افزوده و محلول برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس 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 اندازه‌گیری گردید.

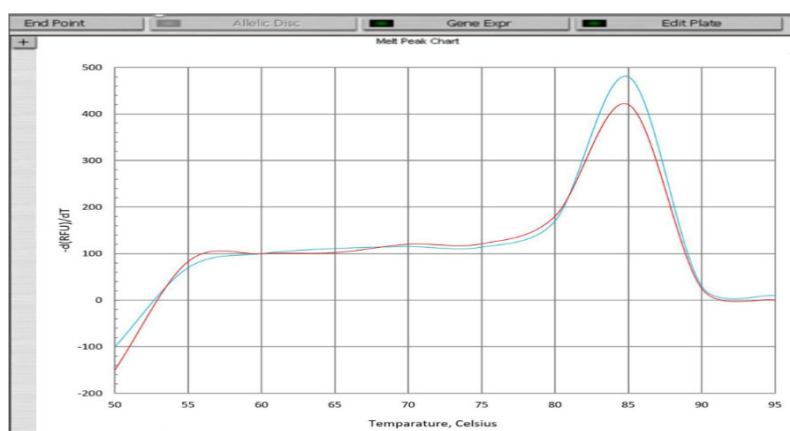
تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها و مقایسات میانگین به روش دانکن به وسیله نرم‌افزار SAS 9.1 و رسم نمودارها با برنامه Excel 2010 انجام شد.

برای اندازه‌گیری TBARM (شاخص اکسیداسیون سلولی) از روش هگگ و همکاران (Hageg et al., 1990) با تغییراتی استفاده گردید. مقدار ۰/۵ گرم برگ هموژنیزه و یک میلی لیتر اسیدتری کلرواستیک (15 w/v درصد) 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 نیم میلی لیتر استون شستشو و پس از ورتکس مجدداً با همان دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد، آخرین مرحله چهار مرتبه تکرار شد. سپس به آن مقدار سه میلی لیتر اسید فسفریک (۱)

Table 1. Specifications of used primers

جدول ۱. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده

نام آغازگر Primer name	توالی آغازگر Primer sequence	طول محصول	واکنش	دمای ذوب Melting Temperature (C°)	شماره دسترسی NCBI در NCBI accession number
		The length of the reaction product	length of the reaction product		
FOR <i>CAT1</i> ,	5'-CCATCTGGCTCTCCTACTGG-3'	141		60	E 16461
REV <i>CAT1</i> ,	5'-AGAACTTGGACGACGGCCCTGA-3'				
FOR <i>MT 1</i> ,	5'-ACACCAAGGGCAGAGCATAG-3'	132		51.4	L 11879
REV <i>MT 1</i> ,	5'-CACTCGTGTGATGGTGTGAG-3'				
FOR <i>GAPDH</i> ,	5'-TCACCACCGACTACATGACC-3'	121		60	EF 592180
REV <i>GAPDH</i> ,	5'-ACAGCAACCTCCTTCTCACC-3'				



شکل ۲. منحنی ذوب ژن‌های کاتالاز و متالوتیونین در Real Time PCR

Fig. 2. Melting curve of catalase and metallothionein genes in Real Time PCR

## 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 بود (جدول ۲). اثر متقابل جیوه در رقم به‌جز در رابطه با کلروفیل a و b برای سایر صفات از لحاظ آماری در سطح یک درصد معنی‌دار گردید.

## کلروفیل

نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل جیوه در ژنوتیپ نشان داد (شکل ۱) محتوای کلروفیل a و b با افزایش غلظت کلرید جیوه در ژنوتیپ‌های مختلف تحت تیمار غلظت‌های مختلف جیوه کاهش یافت. میزان کاهش کلروفیل a و b در ژنوتیپ گنبد (به ترتیب ۴/۸ و ۳/۲۶ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در غلظت ۱۵ میکرومولار بیشتر از ژنوتیپ‌های دیگر بود و اختلاف آن نیز با سایر ژنوتیپ‌ها در سطح احتمال ۵ درصد آزمون دانکن معنی‌دار گردید.

سأها و همکاران (Sahu et al., 2011) نشان دادند تیمار گیاهان با ۲/۵ میکرومولار کلرید جیوه باعث افزایش محتوای کلروفیل شد، اما با افزایش بیشتر غلظت کلرید جیوه مقدار

کلروفیل به‌طور قابل‌توجهی کاهش یافت که با نتایج حاصل از این مطالعه مطابقت داشت. تأثیر فلزات سنگین بر روی پیگمان‌های فتوسنتزی ممکن است به سه دلیل باشد، ۱- با ورود فلزات سنگین به داخل کلروپلاست‌ها و تجمع بالای آن-ها در این اندامک ممکن است تنش‌های اکسیداتیو رخ دهد که موجب آسیب‌هایی از قبیل پراکسیداسیون کلروپلاست‌ها می‌شوند (Seregin et al., 2006)، همچنین آن‌ها می‌توانند به‌طور مستقیم ساختار و عملکرد کلروپلاست‌ها را با اتصال به گروه‌های سولفیدریل آنزیم‌ها از هم‌گسیخته و روی‌هم‌رفته بیوسنتز کلروفیل را تحت تأثیر قرار دهند (Srivastava et al., 2006). ۲- فلزات سنگین جذب و انتقال سایر عناصر ضروری از قبیل Fe<sup>2+</sup>، Mn<sup>2+</sup> و Zn<sup>2+</sup> را به‌وسیله تأثیرات ضدیت مهار می‌نمایند و بنابراین از این طریق ظرفیت سنتز پیگمان‌ها در برگ‌ها تحت تأثیر قرار می‌گیرد (Gardea et al., 2004)، ۳- مشخص شده است که فلزات سنگین در یکی از مراحل آنزیمی تأثیرات مهارکنندگی مستقیم دارند (Singh, 1995). از آنجایی‌که تجزیه کلروفیل پاسخ عمومی به تنش است، می‌توان نتیجه گرفت که تغییرات در میزان کلروفیل یکی از شاخص‌های مهم تنش محیطی است و تحمل گونه‌ها به تنش را توصیف می‌کند.

جدول ۲. تجزیه واریانس صفات به‌صورت اسپلیت پلات در قالب طرح کاملاً تصادفی

Table 2. Analysis of variance of traits as split plot in a completely randomized design

S.O.V	منابع تغییرات	درجه آزادی df	میانگین مربعات				
			بیان ژن کاتالاز CATI	بیان ژن متالوتیونین MTI	TBARM	کلروفیل a Chlorophyll a	کلروفیل b Chlorophyll b
Mercury	جیوه	3	140**	9.23**	2643**	49.3**	28.3**
Error 1	خطای ۱	8	0.91	0.15	12.94	0.26	1.14
Genotype	ژنوتیپ	2	9.08**	10.4**	332.1**	7.73**	14.7**
Mercury×Genotype	ژنوتیپ × جیوه	6	1.59**	1.93**	48.44**	0.32 <sup>ns</sup>	0.19 <sup>ns</sup>
Error 2	خطای ۲	16	0.33	0.12	5.861	0.21	0.41
CV%	ضریب تغییرات		12.3	16.5	2.87	5.29	5.31

ns و \*\* به ترتیب غیر معنی‌داری و معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد

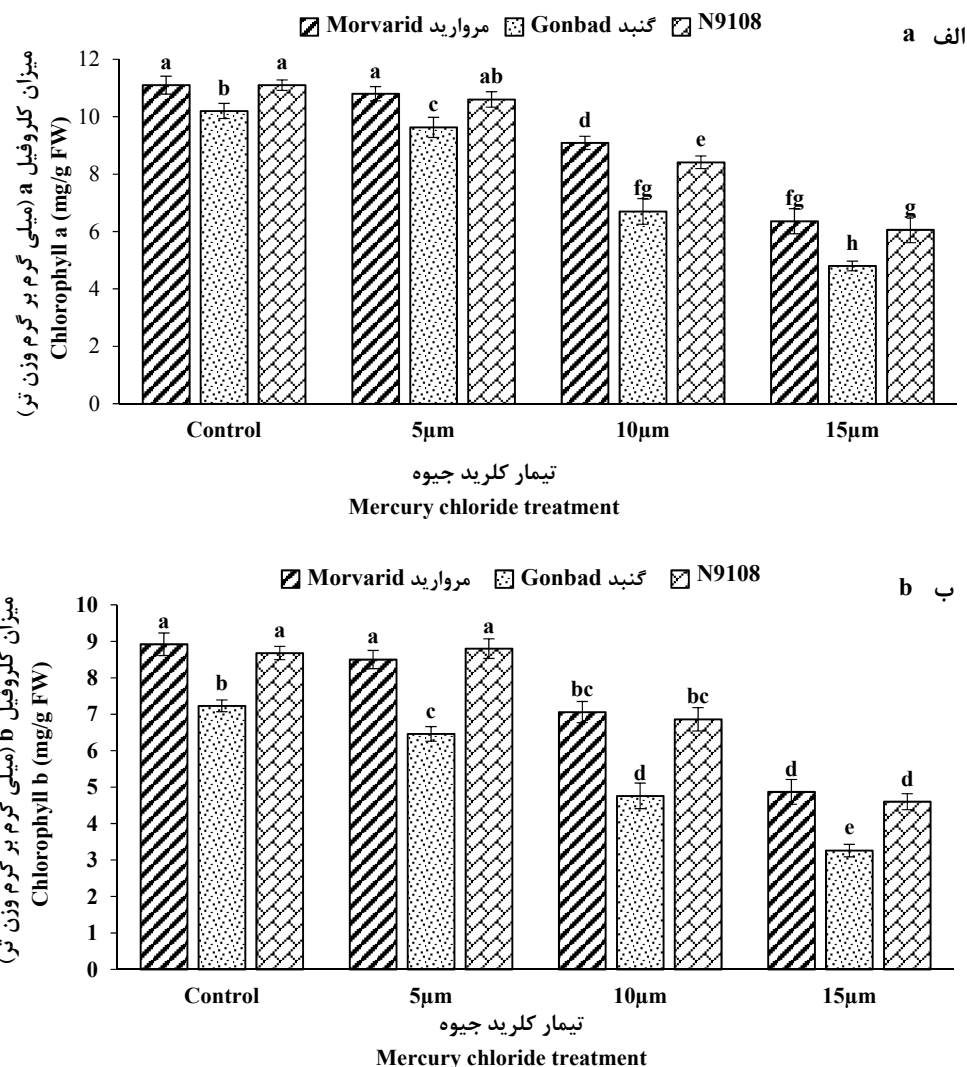
ns, and \*\* non-significant and significant at 1% level respectively

معنی‌داری داشته است که با نتایج حاصل از این پژوهش مطابقت دارد. اسچات و همکاران (Schat et al., 1997)

پارلاک (Parlak, 2016) گزارش کرد که محتوای کلروفیل با افزایش غلظت نیکل در برگ‌های گندم کاهش

فرآیندهای متابولیکی را ممانعت می‌کنند، برای مثال کادمیوم با مهار فعالیت آنزیم پروتوکلروفیلید ردوکتاز با واسطه برهمکنش با گروه‌های سولفیدریل و نیز مهار آنزیم آمینولولینیک‌اسید (ALA) سنتاز باعث کاهش کلروفیل می‌شود (Zengin and Munzuroglu, 2005).

نشان دادند که اضافه کردن فلزات سنگین کروم (۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) و نقره (۵، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار) به سلول‌های سالم سیانوباکتریوم و اسپیرولینا پلاتنیس باعث دگرگونی در فعالیت زنجیره انتقال الکترون و فتوسیستم II می‌شود. همچنین فلزات سنگین معمولاً از طریق مهار فعالیت آنزیم



شکل ۳. تغییرات میزان کلروفیل a (الف) و تغییرات میزان کلروفیل b (ب) در غلظت‌های مختلف کلرید جیوه در ارقام مورد بررسی  
Fig. 3. Changes in chlorophyll a (a) and chlorophyll b (b) changes under different mercury chloride concentrations

محتوای TBARM در غلظت ۱۵ میکرومولار کلرید جیوه به‌طور معنی‌داری (در سطح احتمال ۵ درصد آزمون دانکن) بیشتر از سایر غلظت‌ها بود و این افزایش در رقم گنبد بیشتر

#### اکسیداسیون سلولی

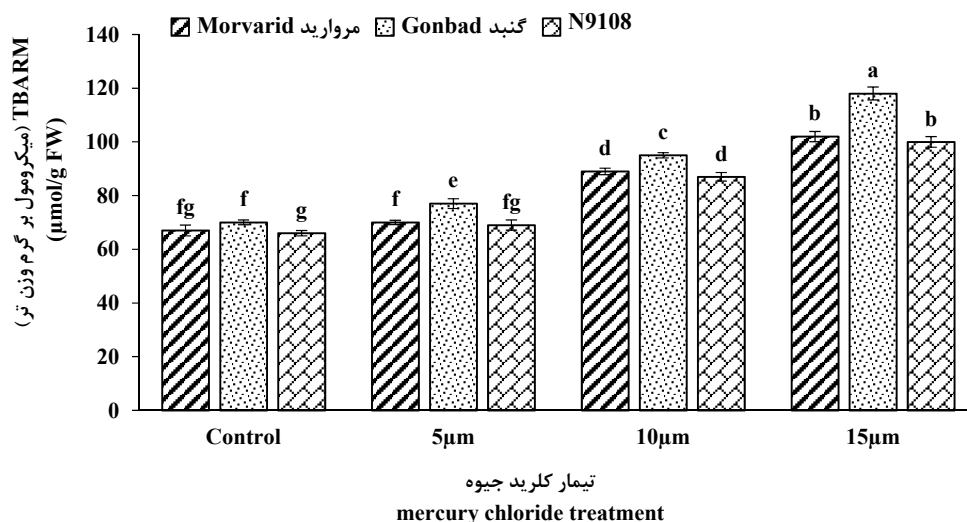
نتایج مقایسه میانگین‌ها برای اثر متقابل جیوه در ژنوتیپ بر روی میزان اکسیداسیون سلولی نشان داد (شکل ۲) که

واکنش‌های اکسیداسیون لیپیدها را تسریع کنند. گزارش شده است که با افزایش میزان پراکسیداسیون لیپید در گیاهان تحت تنش کادمیوم، فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز افزایش می‌یابد (Sandalio et al., 2001).

کاور و همکاران (Kaur et al., 2012) گزارش کردند که در گیاه گندم با افزایش غلظت سرب محتوای TBARM افزایش یافت. در مطالعه مالار و همکاران (Malar et al., 2014) محتوای TBARM در گیاهچه‌های سنبل آبی به‌طور معنی‌داری افزایش و سپس در غلظت‌های بالاتر کاهش یافت. TBARM محصول پراکسیداسیون لیپیدها است که گیاهان تحت استرس قرار دارند و اغلب به‌عنوان شاخصی از میزان استرس اکسیداتیو مورد استفاده قرار می‌گیرد (Hu et al., 2012). 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 (Zhang et al., 2008). 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 (Kaur et al., 2012). لذا گونه‌های فعال اکسیژن سبب القای تنش اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی در گیاه می‌شوند (Verma and Dubey, 2003).

از ژنوتیپ‌های مروارید و N9108 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.

ساحا و همکاران (Sahu et al., 2011) در مطالعات 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. در برگ گیاهانی که تحت تیمار ۲۵ میکرومولار کلرید جیوه بودند میزان 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 (Cho and park, 2000)، خردل (Shiyab et al., 2008) و یونجه (Zhou et al., 2007) گزارش شده است. در هر یک از غلظت‌ها محتوای TBARM در ژنوتیپ‌های مختلف با یکدیگر تفاوت معنی‌دار آماری در سطح احتمال ۵ درصد آزمون دانکن داشتند. در شرایط تنش فرآیندهای مخرب غشاء فعال‌شده و منجر به پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء می‌شوند. به‌عنوان مثال رادیکال‌های آزاد تنش اکسیداتیو حاصل از شرایط محیطی نامناسب باعث آسیب رساندن به لیپیدها و اسیدهای چرب غشایی شده و رادیکال‌های پراکسی و هیدروکسی پراکسی تولید می‌کنند. رادیکال‌های جدید تولیدشده می‌توانند



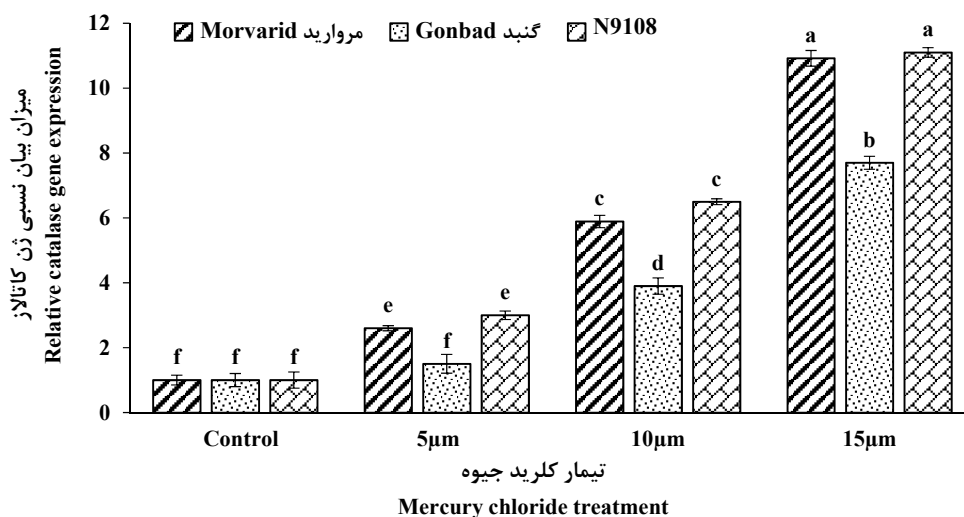
شکل ۴. تغییرات میزان اکسیداسیون سلولی در غلظت‌های مختلف جیوه

Fig. 4. Changes in the amount of oxidation under different concentrations of mercury chloride

2014) در مطالعات خود نشان دادند که در رقم تجن گندم فعالیت کاتالاز تحت تیمار کلرید جیوه ۱۰ و ۲۰ میکرومولار افزایش یافت. برای کم کردن و از بین بردن انواع اکسیژن‌های فعال و اجتناب از آسیب‌های اکسیداتیو در گیاهان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نظیر کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز افزایش می‌یابد (Smeets et al., 2008). از آنجایی که کاتالاز به حفظ هموستازی اکسیژن فعال در زمان تنش‌های زنده و غیرزنده کمک می‌کند، بنابراین فعالیت آن نیز در گیاه به هنگام تنش بیشتر می‌شود (Magbanua et al., 2007). کاتور و همکاران (Kaur et al., 2012) گزارش کردند که در گیاه جو با افزایش غلظت نیکل فعالیت CAT در برگ افزایش یافته و در ریشه تغییر چندانی نداشت. فعال شدن یا مهار فعالیت CAT در حضور فلزات سنگین ممکن است به عنصر، غلظت آن و گونه گیاهی وابسته باشد (Gratao et al., 2005).

#### نتایج بررسی بیان نسبی ژن‌های کاتالاز و متالوتیونین

نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل جیوه در ژنوتیپ برای ژن کاتالاز نشان داد (شکل ۳) که بیشترین میزان بیان این ژن در لاین N9108 و رقم مروارید در غلظت ۱۵ میکرومولار کلرید جیوه بود که به ترتیب با افزایش ۱۱/۱ و ۱۰/۹۲ برابری نسبت به شاهد، اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد با سایر تیمارها نشان داد. همچنین کمترین مقدار بیان این ژن در تیمار ۵ میکرومولار کلرید جیوه و در رقم گنبد مشاهده شد که تنها نسبت به تیمار کنترل ۱/۵ برابر افزایش بیان داشت و اختلاف آن با شاهد در سطح ۵ درصد آزمون دانکن معنی‌دار نشد. ساها و همکاران (Sahu et al., 2011) نشان دادند فعالیت کاتالاز در برگ گندم تحت تیمار ۲/۵، ۵ و ۱۰ میکرومولار کلرید جیوه افزایش یافت. کلرید جیوه باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در برگ‌های گیاه شوید می‌گردد (Noorani Azad et al., 2010). رئیسی و جهانبخش (Raeesi and Jahanbakhsh,



شکل ۵. بیان نسبی ژن کاتالاز در غلظت‌های مختلف کلرید جیوه

Fig. 5. Relative expression of catalase gene under different concentrations of mercury chloride

بیان آن نسبت به تیمار شاهد ۳/۵۳ برابر افزایش یافته بود و اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد با سایر ژنوتیپ‌ها در شرایط مشابه داشت. کمترین میزان بیان ژن در رقم گنبد در غلظت ۵ میکرومولار کلرید جیوه با بیان ۱/۲۲ برابری نسبت به شاهد مشاهده شد که اختلاف آن‌ها در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار نبود ولی با سایر ژنوتیپ‌ها در شرایط مشابه

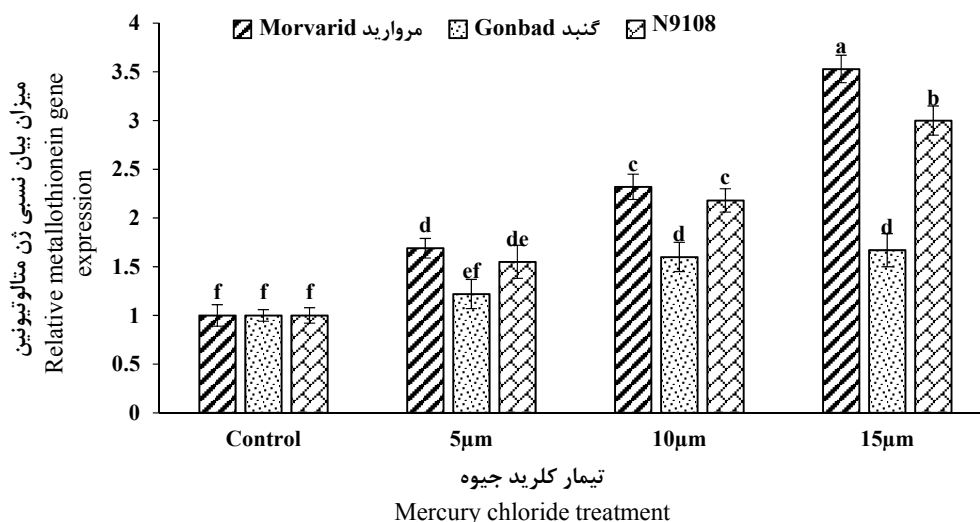
نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل جیوه در ژنوتیپ بیان ژن متالوتیونین نشان داد (شکل ۴) که میزان بیان این ژن تحت غلظت‌های مختلف تنش کلرید جیوه در ژنوتیپ‌های مختلف روند افزایشی همگام با افزایش غلظت کلرید جیوه داشت. بیشترین میزان بیان ژن برای ژنوتیپ مروارید در شرایط کاربرد ۱۵ میکرومولار کلرید جیوه مشاهده شد که



شده برای متالوتیونین‌ها پاک‌سازی رادیکال‌های اکسیژنی و حفاظت سلول‌ها در برابر تنش اکسیداتیو است (Akashi et al., 2004). طی آزمایشی بر روی گیاه آراییدوپسیس تالیانا نتایج نشان داده است که بیان ژن متالوتیونین (AtMT4a) در بافت‌های رویشی در مراحل مختلف رشد، باعث تحمل بیشتر به Zn و Cu می‌شود (Rodriguez-Llorente, 2010). همچنین در درخت تراریخته خرّآ (Avicennia marina) که ژن AmMT2 را بیان می‌کند تحمل بیشتر به Cu، Cd، Zn و Pb گزارش شده است (Huang and Wang, 2010). در همین راستا گو و همکاران (Guo et al., 2013) طی پژوهشی بر روی بیان ژن متالوتیونین تحت تنش فلزات سنگین گزارش نمودند، کاربرد کادمیوم (Cd) موجب کاهش بیان این ژن گردید ولی تحت تنش مس (Cu) بعد از ۱۲ ساعت بالاترین مقدار بیان برای این ژن مشاهده گردید.

اختلاف آن در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود. همچنین نتایج نشان داد که در ژنوتیپ مروارید و N9108 با افزایش غلظت کلرید جیوه روند بیان این ژن افزایشی بود و اختلاف بین سطوح مختلف کاربرد کلرید جیوه در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود. در ژنوتیپ گنبد میزان بیان ژن متالوتیونین در غلظت ۱۵ میکرومولار اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد با بیان آن در غلظت ۱۰ میکرومولار نداشت.

متالوتیونین‌ها به دلیل قابلیت بالای اتصال فلز می‌توانند کاتیون‌های دو ظرفیتی به‌ویژه روی و مس موردنیاز برای متالوآنزیم‌ها و فاکتورهای رونویسی را تأمین نمایند (Blindauer et al., 2008)، همچنین این پروتئین‌ها قادر هستند با کلاته کردن یون‌های فلزی غیرضروری مانند جیوه سلول‌ها را از آسیب غلظت‌های سمی این فلزات حفظ نمایند (Domenech et al., 2007). از دیگر نقش‌های پیشنهادی



شکل ۶. بیان نسبی ژن متالوتیونین در غلظت‌های مختلف کلرید جیوه

Fig. 6. Relative expression of metallothionein gene under different concentrations of mercury chloride

از آنجایی که میزان کلروفیل به‌عنوان یکی از اولین شاخص‌هایی که تحت تأثیر تنش اکسیداتیو قرار می‌گیرد، 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

### نتیجه‌گیری نهایی

به‌طورکلی از نتایج حاصل چنین استنباط می‌شود که تأثیر کاربرد کلرید جیوه موجب بروز تنش اکسیداتیو گردیده و بر فرآیندهای بیوشیمیایی و بیان ژن‌ها در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه تأثیرگذار بوده است و همچنین پاسخ ژنوتیپ‌ها به کاربرد مقادیر مختلف کلرید جیوه متفاوت است.

این ژنوتیپ‌ها افزایش کمتری تحت تأثیر افزایش غلظت کلرید جیوه داشت. بر اساس نتایج این تحقیق می‌توان بیان نمود این ژنوتیپ‌ها متحمل به تنش کلرید جیوه بوده که می‌توان پس از انجام سایر آزمایش‌های تکمیلی از آن‌ها در پروژه‌های اصلاحی بعدی به‌عنوان ارقام مطلوب در تحمل به تنش کلرید جیوه بهره برد.

توجه به نتایج این آزمایش به نظر می‌رسد که سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی از جمله بیان ژن‌های کاتالاز و متالوتیونین نقش مهمی در راهکار دفاعی گیاه گندم در برابر تنش فلز جیوه ایفا می‌کند. همان‌طور که در نتایج مشاهده گردید میزان بیان ژن کاتالاز و متالوتیونین در ژنوتیپ‌های مروارید و N9108 بیشتر بود و کاهش کمتری از نظر مقدار کلروفیل نیز در آن‌ها مشاهده گردید. از طرفی سطح اکسیداسیون سلولی نیز در

## منابع

- Akashi, K., Nishimura, N., Ishida, Y., 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.
- 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, 57-62.
- Blindauer, C.A., 2008. Metallothioneins with unusual residues: histidines as modulators of zinc affinity and reactivity. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 102, 507-521.
- Cailin, G., Yan, D., Zegang, W., Dingzhen, W., Yulong, W., Qi, S., Shishi, L., 2008. Responses of wheat seedlings to cadmium, mercury and trichlorobenzene stresses. *Journal of Environmental Sciences*. 21, 806-813.
- Chelikani, P., Fita, I., Loewen, P.C., 2004. Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 61, 192-208.
- Cho, U., Park, J., 2000. Mercury-induced oxidative stress in tomato seedlings. *Plant Sciences*. 156, 1-9.
- Cobbett, C., Goldsbrough, P., 2002. Phytochelatin and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology*. 53, 159-182.
- Du, Y.Y., Wang, P.C., Chen, J., Song, C.P., 2008. Comprehensive functional analysis of the catalase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Integrative Plant Biology* 50, 1318-1326.
- Domenech, J., Orihuela, R., Mir, G., Molinas, M., Atrian, S., Capdevila, M., 2007. The CdII binding abilities of recombinant *Quercus suber* metallothionein: Bridging the gap between phytochelatin and metallothioneins. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 12, 867-882.
- Foyer, C.H., Lelandais, M., Kunerk, K.J., 1994. Oxidative stress in plants. *Physiology Plant*. 92, 696-717.
- Freisinger, E., 2007. Spectroscopic characterization of a fruit specific metallothionein *M. acuminata* MT3. *Inorganica Chimica Acta*. 360, 369-380.
- Gardea-Torresdey, J.L., Peralta-Videa, J.R., Montes, M., Rose, G.D., Corral-Diaz, B., 2004. Bioaccumulation of cadmium, chromium and copper by (*Convolvulus arvensis* L.): Impact on plant growth and uptake of nutritional elements. *Bioresource Technology*. 92, 229-235.
- Gratao, P.L., Polle, A., Lea, P.J., Azevedo, R.A., 2005. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology*. 32, 481-494.
- Guo, J., Xu, L., Su, Y., Wang, H., Gao, S.H., Xu, J., Que, Y., 2013. ScMT2-1-3, a Metallothionein Gene of Sugarcane, Plays an Important Role in the Regulation of Heavy Metal Tolerance/Accumulation. *BioMed Research International*. p.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.
- Hassinen, V., Tervahauta, A.I., Schat, H., Karenlampi, S., 2011. Plant metallothioneins –

- metal chelators with ROS scavenging activity. *Plant Biology*, 13, 225-232.
- Hu, R., Sun, K., Su, X., Pan, Y.X., Zhang, Y.F., 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.
- Huang, G.Y., Wang, Y.S., 2010. Expression and characterization analysis of type 2 metallothionein from grey mangrove species (*Avicennia marina*) in response to metal stress. *Aquatic Toxicology*. 99(1), 86-92.
- Irannezhad, H., Shahbaziyan, N., 2005. *Cereals Cultivation*. Vol. 1: Wheat. Tehran University Press, Abu Riauhan Higher Education Complex. P, 274 [In Persian].
- Islam, E., Yang, X.E., Li, T.Q., Liu, D., 2007. Effect of Pb toxicity on root morphology, physiology and ultrastructure in the two ecotypes of *Elsholtzia argyi*. *Journal of Hazardous Materials*. 147(3), 806-16.
- Kazemi, G., Navabpour, S., Ramezanzpour, 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 summary].
- 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.
- Magbanua, Z.V., Moraes, C.M., Brooks, T.D., Williams, W.P., Luthe, D.S. 2007. Is catalase activity one of the factors associated with maize resistance to *Aspergillus flavus*? *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 20, 697-706.
- Malar, S., Vikram, S.S., Favas, P.J., Perumal, V., 2014. Lead heavy metal toxicity induced changes on growth and antioxidative enzymes level in water hyacinths [*Eichhornia crassipes* (Mart.)]. *Botanical Studies*. 55, 54-68.
- Moloudi, F., Navabpour, S., Soltanloo, H., Ramezanzpour, 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.
- Noorani azad, H., Hajibagheri, M.R., Chobineh, D., Ejraee, A.K., 2010. The study of HgCl<sub>2</sub> toxicity on the growth and some biochemical traits in Dill (*Anethum graveolens* L.). *Journal on Plant Science Researches*. 2, 19-27.
- 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.
- Pourakbar, L., Ashrafi, R., 2011. Effect of cadmium on generation of hydrogen peroxide and activities of some antioxidant enzymes in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Science*. 9, 484-473.
- 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].
- Rodriguez-Llorente, I.D., 2010. Expression of the seed-specific metallothionein mt4a in plant vegetative tissues increases Cu and Zn tolerance. *Plant Science*. 178(3), 327-332.
- 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.
- 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].
- 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.
- Schat, H., Sharma, S.S. and Vooijs, R., 1997. Heavy metal- induced accumulation of free proline in a meta-tolerant and a nonotolerant ecotype of *Silene vulgaris*. *Physiologia Plantarum*. 101(3), 477-482.
- Seregin, I.V., Kozhevnikova, A.D., 2006. Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology*. 53, 257-277.
- Sharma, A., Jha, A.M., Dubey, R.S., Pessaraki, M., 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plant under stressful conditions. *Journal of Botany*. 26, 1-26.

- 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.
- Singh, V.P., 1995. Toxic metal cadmium. In: Trivedy R.K. (ed.), *Phytotoxicity and tolerance in plants*. Advances in Environmental Science Tehnology, Ashish Publication House, New Delhi. Pp. 225-256.
- Smeets, K., Ruytinx, J., Semane, B., Van Belleghem, F., Remans, T., Van Sanden, S., Cuypers, A., 2008. Cadmium-induced transcriptional and enzymatic alterations related to oxidative stress. *Environmental and Experimental Botany*. 63(1), 1-8.
- Solhi, M., Malakuti, M.J., Samavat, S., 2005. Distribution and concentration of heavy metals in the life cycle (soil, water, plants, animals and humans). Soil and Water Research Institute, Technical Bulletin, Tehran: Sana Publication. 470, 3-37.
- Srivastava, S., Mishra, S., Tripathi, R. D., Dwivedi, S., Gupta, D.K., 2006. Copper induced oxidative stress and responses of antioxidants and phytochelatins in *Hydrilla verticillata* (L.f.). *Royle Aquatic Toxicology*. 80(4), 405-415.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.



*Original article*

## Investigation of antioxidant genes and some biochemical traits of bread wheat under mercury metal stress

H. Najafi<sup>1</sup>, S. Navabpour<sup>2\*</sup>, Kh. Zynalinejad<sup>3</sup>

1. Msc student of Agricultural Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran

2. Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

3. Assistant Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

Received 28 October 2018; Accepted 6 January 2019

### Abstract

Mercury, as a heavy metal element, plays an important role in contaminating the environment and causing toxicity and stress in living organisms. Among heavy metals, mercury is considered to be the most toxic metal in the environment. This metal is considered as the major environmental pollutant. Base on this, a split plot experiment was conducted in a completely randomized design with 3 replications in hydroponic condition. The treatments consisted of mercury chloride with concentrations (0 as control, 5, 10 and 15  $\mu\text{M}$ ) as main factor and bread wheat genotypes (Morvarid, Gonbad cultivar and N9108 line) as sub factor. Results showed that the expression of catalase and metallothionein gene was increased in Morvarid and N9108 genotypes by mercury chloride and the highest expression of these genes was obtained by treatment with 15  $\mu\text{M}$  mercuric chloride (9.2 and 2.7 times more than control). By increasing the concentration of mercury chloride, there was a significant decrease in the chlorophyll content of different genotypes, as well as mercuric chloride significantly increased the TBARM (cellular oxidative index) in the treated seedlings compared with the control. It can be concluded that the Morvarid cultivar and the promising line N9108 under heavy metal stress showed a better response than the Gonbad. According to the results of this experiment, it seems that the antioxidant defense system plays an important role in the defense strategy of the wheat plant against the tension of mercury metal and this defense system is induced and activated at the transcriptional level to help the plant.

**Keywords:** Catalase, Hydroponic culture, Mercury Chloride, Wheat, Metallothionein, Seedling stage.

\*Correspondent author: Saeed Navabpour; E-Mail: [navabpour@yahoo.com](mailto:navabpour@yahoo.com)