ژنتیک نوین
دوره نوزدهم، شماره ٤، زمستان ١٤٠٣
صفحه ٢٩٣ - ٢٨٣

ارزیابی بیان برخی ژن‌های دفاعی و صفات بیو شیمیایی در واکنش به تیمار سطوح کروم در گندم نان

Evaluation of the expression of some defense genes and biochemical traits in response to treatment of chromium levels in bread wheat

مریم پاکدل[1]، سعید نواب‌پور*[2]، سیده ساناز رمضان‌پور[3]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی ومنابع طبیعی، گرگان
۲- استاد گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژِی کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی ومنابع طبیعی، گرگان
۳- دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژِی کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی ومنابع طبیعی، گرگان

Pakdel M[1], Navabpour S*[2], Ramzanpour S[3]

1- MSC in Plant Breeding, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
2- Associate Professor, Department of Plant Breeding and Agricultural Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
3- Associate Professor, Department of Plant Breeding and Agricultural Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: s.navabpour@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ١٤٠٢/٠٩/١١ - تاریخ پذیرش: ١٤٠٣/١٢/١٤)

چکیده

در میان آلاینده‌های محیطی، فلزات سنگین به‌دلیل غیرقابل تجزیه بودن و اثرات فیزیولوژیکی که بر موجودات زنده در غلظت‌های کم دارند، از اهمیت خاصی برخوردارند. این عناصر به‌دلیل تحرک کم به مرور در خاک انباشته می‌شوند. انباشت این عناصر در خاک در نهایت باعث ورود آن‌ها به چرخه غذایی و تهدید سلامت انسان و سایر موجودات می‌شود. در این مطالعه آزمایشی روی دو رقم گندم رایج در منطقه و یک لاین امیدبخش به‌صورت فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی در ۳ تکرار انجام شد. فاکتور دی کرومات پتاسیم با غلظت‌های صفر (شاهد)، ۰/۵، ۱/۵ و ۲/۵ میلی‌گرم در کیلو گرم خاک انجام شد. در این مطالعه ارزیابی بیان ژن‌های کاتالاز، متالوتایینین و آسکوربات پراکسیداز با استفاده از تکنیک Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفت. همچنین برخی صفات بیوشمیایی شامل کلروفیل a وb و شاخص اکسیداسیون اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد مقدار کلروفیل a و b تحت تأثیر سمیت کروم در هر سه ژنوتیپ کاهش یافت. اندازه‌گیری میزان اکسیداسیون سلولی نشان داد با کاربرد و افزایش مقدار دی کرومات پتاسیم مقدار اکسیداسیون سلولی افزایش یافت که بیشترین مقدار در رقم گنبد مشاهده شد. ارزیابی مقدار بیان ژن‌ها تحت تنش دی کرومات پتاسیم نشان داد مقدار بیان ژن کاتالاز و متالوتیونین تحت تأثیر سمیت کروم نسبت به تیمار شاهد افزایش بیان داشت و با افزایش غلظت آن بیان این ژن‌ها افزایش بیشتری یافت. در رابطه با ژن آسکوربات پراکسیداز نتایج نشان داد در تیمار کاربرد ۰/۵ میلی‌گرم دی کرومات پتاسیم مقدار بیان این ژن بیشترین افزایش را داشت و با افزایش غلظت آن مقدار بیان این ژن کاهش یافت، ولی مقدار آن بیشتر از تیمار شاهد بود. بر اساس نتایج این تحقیق می‌توان بیان نمود رقم مروارید و لاین N9108 متحمل به تنش فلز کروم بوده که می‌توان پس از انجام سایر آزمایش‌های تکمیلی از آن‌ها در پروژه‌های اصلاحی بعدی به‌عنوان ارقام مطلوب در تحمل به تنش فلز کروم بهره برد.

واژه‌های کلیدی

دی کرومات پتاسیم
کاتالاز
متالوتایینین
آسکوربات پراکسیداز
گندم

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-17]

مقدمه

فلزات سنگین از جمله مهم‌ترین آلاینده‌های زیست محیطی محسوب می‌شوند. عمر دراز مدت بیولوژیکی این فلزات در خاک موجب تجمع آن‌ها در زنجیره غذایی شده و زمینه ساز بروز اثرات منفی بر سلامت انسان می‌شوند (Farzaneh.2001). اخیرا آلودگی در حال گسترش خاک با فلزات سنگین نگرانی جدی در تولید محصولات کشاورزی به وجود آورده است (Feng et al. 2021). برخی فلزات به مقدار ناچیز برای عملکرد طبیعی بدن ضروری می‌باشند اما ورود بیش از اندازه آن‌ها به بدن مسمومیت ایجاد خواهند کرد. مشکل اصلی فلزات سنگین این است که در بدن متابولیزه نمی‌گردند. خلاصه کاربری چند منبع طبیعی و روند رشد صنعتی شدن باعث بالا رفتن اهمیت جهانی اثر فلزات سمی در میکرو ارگانیسم‌های زنده می‌شود (Isarankura et al. 2009). فلزات سنگین ممکن است آنزیم‌های اصلی را از طریق جایگزین شدن با کاتیون‌های فعال‌کننده، غیر فعال نمایند (Koocheki et al. 2009). کروم یکی از مشکل آفرین‌ترین فلزات سنگین می باشد زیرا به چندین حالت اکسایشی وجود دارد که اصلی‌ترین آن‌ها کروم سه و شش ظرفیتی هستند (Gosh and Singh 2005). کروم شش ظرفیتی برای همه گیاهان و حیوانات سمی بوده و شدیداً سرطان زاست و حلالیت و قابلیت دسترسی بالایی در آب و خاک دارد (Goyer and Clarkson 2001). ترکیب سه ظرفیتی در مقدار کم به‌صورت ریز مغذی برای متابولیسم گلوکز، چربی و پروتیین پستانداران مورد نیاز است، ولی مقادیر زیاد آن برای جانوران و گیاهان ممکن است مخاطره‌آمیز باشد (William et al. 2000). یون‌های کروم سبب تنش اکسیداتیو شده که به دنبال آن گونه‌های اکسیژن فعال را در گیاهان تولید می‌کنند، این فرآیند سبب آسیب در ساختارپروتیین‌ها، کربوهیدرات‌ها و لیپیدهای غشایی شده و متابولیسم سلولی را دچار اختلال می‌کند (Pereira et al. 2021). تجمع گونه‌های فعال اکسیژن در سلول منجر به فعال کردن مسیرهای سیگنال‌دهی اختصاصی شده که با اکسید کردن پروتئین‌های خاص و تاثیر بر عوامل رونویسی سبب تغیر الگوی بیان ژن‌ها در پاسخ به تنش شده و در نهایت سلول را برای سازگاری به شرایط جدید آماده می‌کند (Seyed Rahman et al. 2013).

برای کم کردن و از بین بردن انواع اکسیژن‌های فعال و اجتناب از آسیب‌های اکسیداتیو در گیاهان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نظیر کاتالاز و سوپراکسیددیسموتاز و پراکسیداز افزایش می‌یابد (Smeets et al.2008). کاتالاز بالاترین و سریع‌ترین پتانسیل از بین بردن پراکسید هیدروژن را در بین آنزیم‌ها دارا است و با همکاری پراکسیداز و دیگر آنزیم‌ها، پراکسیدهیدروژن تولید شده در شرایط تنش را از بین می‌برد (Foyer et al. 1994). کاهش فعالیت کاتالاز و اسکوربات پراکسیداز به‌ترتیب در ارقام الوند و زرین گندم می‌تواند سبب تجمع پراکسید هیدروژن شود که علاوه بر اجرای واکنش هابر-ویز سبب کاهش فعالیت برخی از آنزیم‌های چرخه کالوین نظیر ریبولوز منوفسفات کیناز و بیس فسفاتاز می‌شود (Asada 2000). ژن آسکوربات پراکسیداز موجب احیای پراکسید هیدروژن آب شده و درنتیجه به‌طور مستقیم سبب حذف گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود. ژن اسکوربات پراکسیداز در کلروپلاست، پراکسی‌زوم، میتوکندی و سیتوزول حضور دارد (Chance and Maehly 1979). مطالعات نشان داده است که عوامل متعددی مانند تجمع ایزوتیوسیانات و روی نیز می تواند درتشدید تنش اکسیداتیو نقش داشته باشد و باعث القاء مسیر گلوتاتیون و افزایش فعالیت آنتی اکسیدان مانند آسکوربات پراکسیداز شوند (Tavakoli Zanyani et al.2013; Hosseiniand Pourakbar 2013). متالوتیونین (MTL) دارای جرم مولکولی ۸-٤ کیلو دالتون بود، پروتئین‌های غنی از سیستئین است که می توانند به فلزات متصل گردد. گزارش‌های قبلی نشان داده است که متالوتیونین در پاسخ به تنش اکسیداتیو در گیاه آرابیدوپسیس تالیانا نقش دارد. در تنش‌هایی چون سرما، خشکی، فلزات سنگین بیان ژن Mtl القاء می‌شود، H2O2 افزایش می‌یابد، که در این حالت محصول ژن Mtl، H2O2 را پاکسازی کرده و باعث حفاظت گیاه می‌شود (Lanfranco et al. 2002). این پروتئین قابلیت اتصال به یون‌های فلزی فیزیولوژیک نظیر روی و مس را دارد همچنین می‌تواند از طریق بنیان‌های تیول با اتصال به فلزات سنگین با منشأ خارجی احتمالاً در تحمل سمّیت فلزات نیز مؤثر باشد (Perales-Vela et al. 2002). به‌علت پایداری زیست محیطی فلزات سنگین و نیز افزایش استفاده از این مواد، امروزه مشکل آلودگی حاصل از آن‌ها به یکی از مهمترین معضلات

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-17]

زیست محیطی بشر تبدیل شده است (Lajem Orak Remecheri et al. 2021) به همین منظور در این پژوهش به ارزیابی الگوی بیان ژن‌های مورد مطالعه در واکنش به تیمار کروم و همچنین بررسی میزان ارتباط روند بیان ژن‌های مورد مطالعه با سایر صفات مورد ارزیابی و معرفی ژنوتیپ برتر پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار در گلخانه دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. فاکتورهای آزمایشی شامل ژنوتیپ مشتمل بر ارقام گنبد، مروارید و لاین امید بخش N9108 و فاکتور دی‌کرومات پتاسیم با غلظت‌های صفر (شاهد)، ۰/۵، ۱/۵ و ۲/۵ میلی گرم در کیلو گرم خاک بود. بذرهای گیاه گندم پس از ضد عفونی در گلدان های ۷ کیلو گرمی در شرایط گلخانه کشت شدند. تنش دی کرومات پتاسیم، برروی ژنوتیپ های مورد نظر در مرحله ۳-۲ برگی(همراه با آب آبیاری) اعمال شد. پس از رسیدن گیاهان تحت تیمار آزمایشی به مرحله حداکثر رشد رویشی مرحله ۳۹ زادوکس ، تعدادی نمونه برگی برای اندازه گیری صفات بیوشیمیایی از گلدان‌ها برداشت شد و همچنین تعدادی نمونه برگی از هر گلدان برای انجام آزمایشات بیان ژن نیز برداشت شد و در فویل آلومینیومی پیچیده و به فریزر ۸۰- انتقال داده شد.

اندازه‌گیری کلروفیل

برای استخراج کلروفیل ۰/۵ گرم از بافت برگ یخ زده 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 اسپکتروفوتومتر WAP مدل S۲۰۰۰UV/vis، در طول موج‌های ٦٦٣ و ٦٤٥ نانومتر جذب محلول اندازه‌گیری شد و میزان کلروفیل a و b از فرمول‌های زیر محاسبه گردید.

$$Chla\ (mgml^{-1}) = 12.25A_{663.6} - 2.55A_{646.6}$$
$$Chlb\ (mgml^{-1}) = 20.31A_{646.6} - 4.91A_{663.6}$$

سنجش اکسیداسیون سلولی([1] TBARM)

در این سنجش که معیاری برای اندازه گیری میزان تنش اکسیداسیونی است، مقدار مالون دی آلدیید که محصول نهایی و نسبتاً پایدار واکنش اکسیداسیون مولکول‌های بزرگ است اندازه گیری می‌شود. در این خصوص از روش Hagege et al. (1990) استفاده گردید.

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 استخراج‌شده، با الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد تعیین گردید. کمیت RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مورد بررسی قرار گرفت. کیفیت RNA با توجه به شاخص A260/280 ارزیابی شد.

ساخت cDNA

سنتز cDNA با روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز نام کیت ؟ صورت گرفت و به‌وسیله آغازگرهای ژن خانه دار *GAPDH* با استفاده از PCR، cDNA سنتز شده آزمون گردید.

طراحی آغازگرها ژن ها توضیح داده نشده اند

آغازگرهای چه ژن هایی؟؟؟؟ موردنیاز بر اساس اطلاعات موجود در سایت NCBI و با استفاده از نرم‌افزار پرایمر ۳ و در نظر گرفتن خصوصیات مطلوب برای استفاده در روش QRT-PCR طراحی شدند. به منظور نرمال سازی داده‌ها از ژن خانه‌دار *GAPDH* که دارای بیان یکسانی در تمام تیمارها می‌باشد، استفاده شد .

[1] Thiobarbioturic Acid Reactive Materia; TBARM

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده

نام آغازگر	توالی آغازگر	طول محصول واکنش (bp)	دمای ذوب (ºC)
FOR CAT1,	5′-CCATCTGGCTCTCCTACTGG-3′	141	60
REV CAT1,	5′-AGAACTTGGACGACGGCCCTGA-3′		57.9
FOR Met,	5′-ACTGCAAGTGCAACCCCTGC-3′	214	65.91
REV Met,	5′-GCATAGGCGGAGAGCGAGCA-3′		68.28

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-17]

FOR APX,	5′-TGCTGTAGGCTTTGGTCCTCG-3′	171	62
REV APX,	5′-AGACTGTTTCACGGCTCCGTTGG-3′		62
FOR GAPDH,	5′-TCACCACCGACTACATGACC-3′	175	62.53
REV GAPDH,	5′-ACAGCAACCTCCTTCTCACC-3′		64.49

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات چه صفاتی؟ به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی!!!!
(عنوان کامل و مستقل از متن باشد)

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		ااکسیداسیون سلولی	کلروفیل a	کلروفیل b
رقم	۲	۷۲۹/۳**	۸/۱٤**	۱٦/۰**
دی کرومات پتاسیم	۳	٦۷۷۷**	٥۱/۷**	۲۰/۳**
رقم × دی کرومات پتاسیم	٦	۱۱۸/۲**	۰/٤۷۲**	۰/٦۳ns
خطا	۱٦	۹/۹۱٦	۰/۰٥٥	۰/۳٤
ضریب تغییرات	-	۳/۲۹	۲/۸٤	۸/۸٤

ns و** به‌ترتیب غیر معنی‌داری و معنی‌داری در سطح احتمال پنج و یک درصد

تجزیه داده‌ها

داده‌های به‌دست 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 شد.

بیان نسبی ژن‌های مورد بررسی با استفاده از فرمول Pfaffl (2002) et al. زیر محاسبه شد.

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

در این معادله نسبت سطح بیان یک ژن هدف بر اساس راندمان واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (E) برای ژن هدف و مرجع و تفاوت (Δ) نقطه تقاطع[1] (CP) یک نمونه ناشناخته در مقابل کنترل (Δ CP control-sample) محاسبه می‌شود. ارزیابی میزان بیان ژن توسط نرم‌افزار Excel و REST انجام شد. در این آزمایش، نمونه‌ها را 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 تجزیه واریانس (جدول ۲) نشان داد اثر متقابل رقم در دی کرومات پتاسیم در رابطه با صفات اکسیداسیون سلولی و کلروفیل a در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود ولی برای صفت کلرفیل b معنی‌دار نشد.

اکسیداسیون سلولی

همان‌طور که در شکل۱ مشاهده می‌شود، مقایسه میانگین اثر متقابل تیمار در ژنوتیپ نشان داد در هر سه ژنوتیپ با افزایش میزان کاربرد دی کرومات پتاسیم میزان اکسیداسیون سلولی افزیش یافت و رقم گنبد با میزان اکسیداسیون سلولی ۱٤۹ نانومول بر گرم بالاترین مقدار را داشت که در شرایط کاربرد ۲/٥ میلی‌گرم دی کرومات پتاسیم مشاهده شد و اختلاف آن نیز با سایر تیمارها در سطح احتمال ٥ درصد آزمون LSD معنی‌دار بود. کمترین میزان اکسیداسیون سلولی در لاین N9108 در شرایط عدم کاربرد دی کرومات پتاسیم (شاهد) مشاهده شد (٦٦ نانومول بر گرم) ولی اختلاف آن با میزان اکسیداسیون سلولی در رقم مروارید (٦۷ نانومول بر گرم) و رقم گنبد (۷۰ نانومول بر گرم) در شرایط مشابه معنی‌دار نشد. در شرایط تنش زا فرایندهای مخرب غشاء فعال شده و منجر به پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء می‌شوند. به‌عنوان مثال رادیکال‌های آزاد تنش اکسیداتیو حاصل از

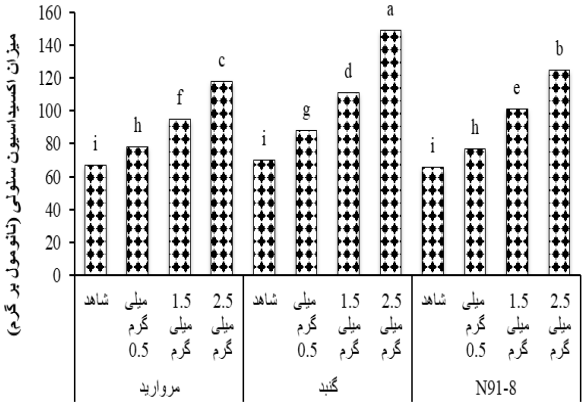
نتایج و بحث

شرایط محیطی نامناسب باعث آسیب رساندن به لیپیدها و

[1] Crossing point

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-17]

اسیدهای چرب غشایی شده و رادیکال های لیپید و پراکسی و هیدروکسی پراکسی تولید می‌کنند. رادیکال‌های جدید تولید شده می‌توانند واکنش‌های اکسیداسیون لیپیدها را تسریع کنند (Sandalio et al. 2001). هنگامی که گیاهان در معرض غلظت های مختلف کروم قرار می‌گیرند، فرآیند پراکسیداسیون لیپیدی آغاز می‌شود. محصول پراکسیداسیون لیپیدها مالون دی آلدئید است که به‌عنوان شاخص تنش اکسیداتیو در نظر گرفته می‌شود. گزارش شده است در گندم نیز تحت تیمارهای ۱، ۱۰، ۱۰۰ میلی‌مولار کروم فرآیند پراکسیداسیون لیپیدها آغاز شده و محتوای مالون‌دی آلدئید با افزایش غلظت کروم افزایش یافته است (Panda and Khan 2003). در بررسی تاثیر تنش کادمیم روی سورگوم توسط حسن و همکاران (Hassan, et al. 2020) ، رشد به‌طور قابل توجهی کاهش و پراکسید هیدروژن و مالون دی آلدئید افزایش یافت. در بررسی Bahrami et al. (2022) با افزایش غلظت فلزات سنگین، میزان MDA در گندم در شرایط هیدروپونیک افزایش معنی‌دار پیدا کرد.



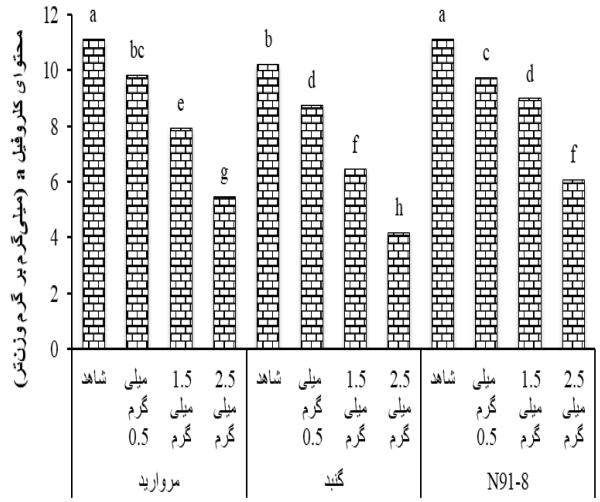
شکل ۱- تغییرات میزان اکسیداسیون سلولی تحت غلظت های مختلف دی کرومات پتاسیم در ارقام مختلف گندم

کلروفیل a و b

مقایسه میانگین اثر متقابل تیمار در ژنوتیپ برای محتوای کلروفیل a نشان داد (شکل۲) در هر سه ژنوتیپ با افزایش میزان کاربرد دی کرومات پتاسیم مقدار کلروفیل a کاهش یافت و رقم گنبد با محتوای کلروفیل a ٤/١٩ میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر کمترین مقدار را داشت که در شرایط کاربرد ۲/۵ میلی‌گرم دی کرومات پتاسیم مشاهده شد و اختلاف آن نیز با سایر تیمارها در سطح احتمال ۵ درصد آزمون LSD معنی‌دار بود. بالاترین میانگین محتوای کلروفیل a در تیمار شاهد و در رقم مروارید و لاین N9108 یکسان و برابر با ۱۱/۱ میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر بود که اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد آزمون LSD با محتوای کلروفیل a رقم گنبد (۱۰/۲۱ میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر) در شرایط مشابه داشتند. از جمله فرآیندهایی که تحت تأثیر تنش ناشی از فلزات سنگین قرار میگیرد فتوسنتز و رنگیزه‌های فتوسنتزی است. فلزات سنگین کاهش فتوسنتز را ممکن است از طریق آسیب به سازماندهی فراساختاری کلروپلاست، تغییر در متابولیت‌های فتوسنتزی، جایگزینی یون‌هایی مانند منیزیم و منگنز و غیره با سرب در کلروپلاست و ممانعت از ساختن یا تجزیه رنگیزه‌های فتوسنتزی القاء کند (Reddy et al. 2005). به‌دلیل تاثیر فلزات بر بیوسنتز کلروفیل و ایجاد تنش اکسیداتیو محتوای کلروفیل در برگ می‌تواند معیاری برای سنجش سمیت محسوب شود. گزارش‌های متعددی مبنی بر اثر فلز کادمیوم بر محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی مانند کلروفیل a و b در بسیاری از گونه‌های گیاهی وجود دارد که این کاهش به اثر بازدارنده کادمیوم بر جذب آهن و منگنز و نیز مهار آنزیم سولفیدریل شرکت کننده در مسیر بیوسنتز رنگیزه‌ها توسط کادمیوم عنوان شده است (Prasad and Strzalka 2002) سنتز کلروفیل را از طریق مختل کردن جذب دیگر یون‌های اساسی مانند منیزیم و یا با افزایش آنزیم تخریب کننده کلروفیل (کلروفیلاز) کاهش می‌دهد (Van and Clijsters 1990). فلزات سنگین به‌وسیله مهار آنزیم‌های گاما آمینو لوالونیک اسید دهیدوژناز و پروتوکلروفیلد ردوکتاز سبب مهار مراحل بیوسنتز کلروفیل می‌شوند (Khatib et al. 2008). با توجه به معنی‌دار نشدن اثر متقابل رقم در دی کرومات پتاسیم برای محتوای کلروفیل b (شکل ۳) مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن انجام شد و نتایج نشان داد با افزایش مقدار دی کرومات پتاسیم محتوای کلروفیل b کاهش یافت. بیشترین محتوای کلروفیل b ۸/۹۲ میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر بود که در رقم مروارید و در تیمار شاهد (عدم کاربرد دی کرومات پتاسیم) مشاهده شد ولی اختلاف آن با محتوای کلروفیل b در لاین N9108 در تیمار شاهد (۸/٦٨ میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر) و کاربرد ۰/۵ میلی‌گرم دی کرومات

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-17]

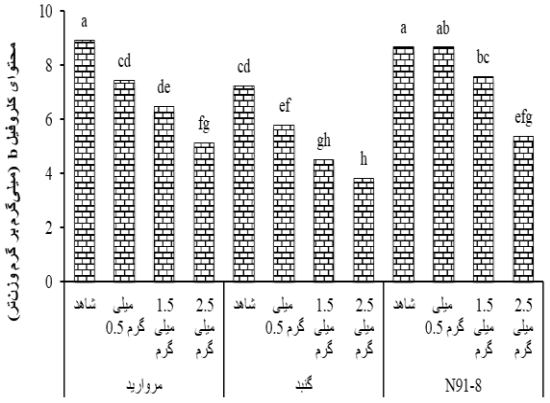
پتاسیم (۸/٦٥ میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر) در سطح احتمال ۵ درصد آزمون دانکن معنی‌دار نشد.



شکل ۲- تغییرات میزان کلروفیل a تحت غلظت‌های مختلف دی کرومات پتاسیم در ارقام مختلف گندم

کمترین مقدار محتوای کلروفیل b در هر سه رقم در تیمار کاربرد ۲/۵ میلی‌گرم مشاهده شد که رقم گنبد با محتوای کلروفیل b ۳/۸۲ میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر کمترین مقدار را دارا بود و اختلاف آن با دو ژنوتیپ دیگر در سطح احتمال ۵ درصد آزمون دانکن معنی‌دار شد. گزارش‌های متعددی مبنی بر اثر کروم بر محتوای کلروفیل و کاروتنوئید در گیاهان وجود دارد بیشتر یافته‌ها حاکی از کاهش محتوای رنگیزه‌ای کلروپلاست تحت تاثیر کروم است (Hu et al. 2005) با این وجود، شواهدی نیز از اثر افزایشی غلظت‌های پایین کروم بر محتوای رنگیزه‌ای برگ گیاهان تحت تنش گزارش شده است (El-Bassam 1978) .El-Bassam. (1978) گزارش داده است که غلظت پایین کروم III باعث ترغیب رشد و تحریک سنتز کلروفیل و فعالیات فتوسنتزی می‌شود. همچنین، گزارش شده است که تولید گونه‌های فعال اکسیژن به‌ویژه اکسیژن یکتای؟؟؟ تحت تأثیر یون‌های کروم می‌تواند افزایش یابد (Pallet and Young 1993).

جانشینی یون Mg^{2+} در مولکول کلروفیل با فلزات سمی مشخص مانند مس، روی، کادمیوم یا جیوه تحت شرایط تنش‌های فلزات سنگین در گیاهان عالی نشان داده شده که باعث کاهش فتوسنتز می‌شود (Marchiolet al. 2004). Huang and Tao. (2004) گزارش کردند که محتوای کلروفیل در حضور غلظت بالای فلز مس در جوانه‌های گیاه *Pinus sylvestris* کاهش یافت و این کاهش در محتوای کلروفیل می‌تواند ناشی از پراکسیداسیون غشاهای کلروپلاست توسط مس باشد.



شکل ۳- تغییرات میزان کلروفیل b تحت غلظت‌های مختلف دی کرومات پتاسیم در ارقام مختلف گندم

نتایج تجزیه واریانس بیان ژن‌ها

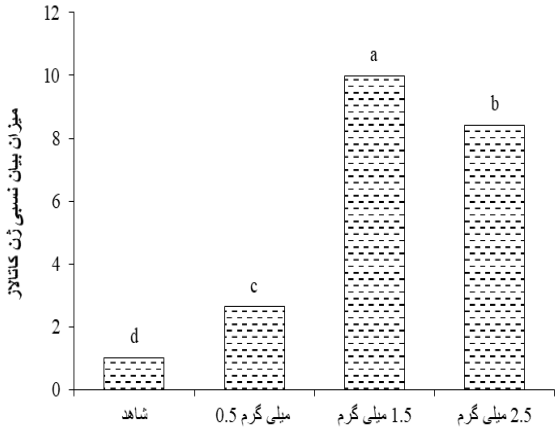
نتایج تجزیه واریانس بیان ژن‌ها نشان داد (جدول ۳) اثر تیمار دی کرومات پتاسیم بر بیان ژن‌های مورد مطالعه در تمامی ارقام در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد.

بیان ژن کاتالاز

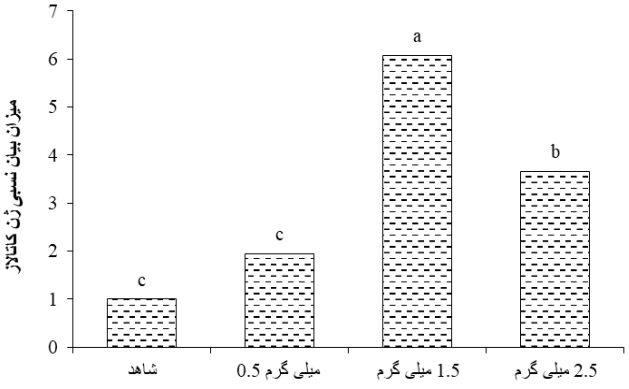
همان‌طور که در شکل ٤ مشاهده می‌شود بیان ژن کاتالاز در رقم مروارید با کاربرد دی کرومات پتاسیم نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری یافت و بیشترین مقدار بیان آن ۹/۹۹ برابر نسبت به تیمار شاهد بود که در شرایط کاربرد ۱/۵ میلی‌گرم دی کرومات پتاسیم مشاهده شد و اختلاف آن با سایر تیمارها نیز در سطح احتمال ۵ درصد آزمون LSD معنی‌دار شد. کاهش بیان این ژن در کاربرد مقادیر بالای دی کرومات پتاسیم (۲/۵ میلی‌گرم) بیانگر سمیت زیاد آن می‌باشد که گیاه قادر به جبران خسارات وارده نیست. کمترین مقدار بیان این ژن نسبت به شاهد ۲/٦۳ برابر بود که در شرایط کاربرد ۰/۵ میلی گرم دی کرومات پتاسیم مشاهده شد و اختلاف آن با سایر تیمارها نیز در سطح احتمال ۵ درصد آزمون LSD معنی‌دار بود. مقایسه میانگین اثر دی کرومات پتاسیم بر روی بیان ژن کاتالاز در رقم گنبد (شکل ۵) و لاین N9801 (شکل ٦) نتایج مشابه با بیان این ژن در رقم مروارید داشت و تنها

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-17]

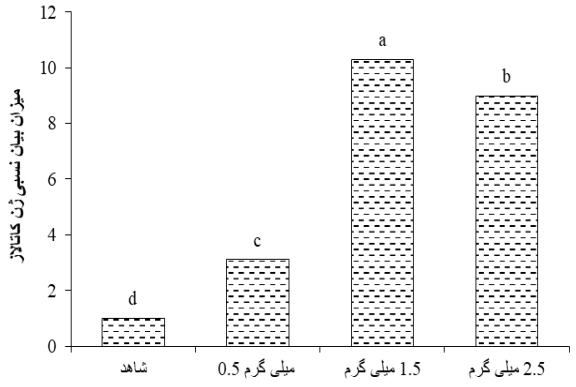
تفاوت در رقم گنبد در بیان ژن کاتالاز در تیمار کاربرد ۰/۵ میلی‌گرم دی کرومات پتاسیم مشاهده شد که اختلاف آن با شاهد در سطح احتمال ۵ درصد آزمون LSD معنی‌دار نشد. کاهش مقدار فعالیت کاتالاز تحت تأثیر مقادیر بالای کروم در نتایج سایر محققین نیز گزارش شده است که با نتایج این تحقیق همسو می‌باشد (اسلام و همکاران، ۲۰۱٤؛ سادیک و همکاران، ۲۰۱۵). در همین راستا Amalia et al. (2016) طی پژوهشی بر روی گیاه موز بیان داشتند مقدار بیان ژن کاتالاز تا غلظت ۲۰۰ppm افزایش بیان نشان داد که این افزایش بیان در ریشه‌ها بیشتر از اندام هوایی بود و علت آن را تقابل مستقیم کروم با ریشه‌ها بیان داشتند.



شکل ٤- میزان بیان نسبی ژن کاتالاز تحت غلظت‌های مختلف دی کرومات پتاسیم در رقم مروارید گندم



شکل ٥- میزان بیان نسبی ژن کاتالاز تحت غلظت‌های مختلف دی کرومات پتاسیم در رقم گنبد گندم

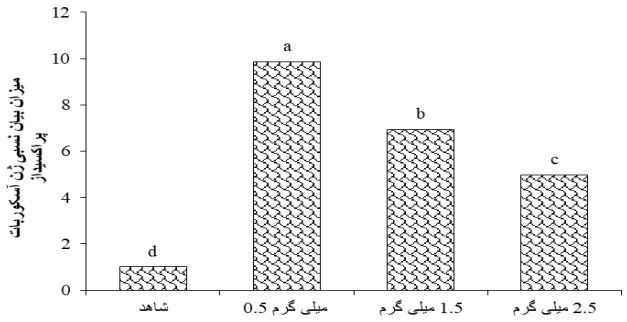


شکل ٦- میزان بیان نسبی ژن کاتالاز تحت غلظت‌های مختلف دی کرومات پتاسیم در لاین N9801 گندم

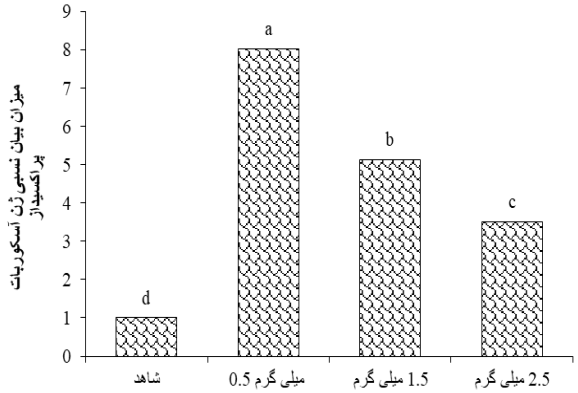
بیان ژن آسکوربات پراکسیداز

مقایسه میانگین بیان ژن آسکوربات پراکسیداز برای رقم مروارید (شکل۷) نشان داد با کاربرد دی کرومات پتاسیم مقدار بیان این ژن نسبت به شاهد افزایش یافت و اختلاف در سطح احتمال ۵ درصد آزمون LSD معنی‌دار بود، اما با افزایش شدت تنش وارده و کاربرد مقادیر بالای دی کرومات پتاسیم مقدار بیان ژن کاهش یافت. بالاترین مقدار بیان ژن آسکوربات پراکسیداز برای رقم مروارید افزایش ۹/۸۵ برابری نسبت به شاهد بود که در تیمار کاربرد ۰/۵ میلی‌گرم دی کرومات پتاسیم مشاهده شد و اختلاف بین تیمارها در سطح احتمال ۵ درصد آزمون LSD معنی‌دار شد. مقایسه میانگین بیان این ژن برای رقم گنبد (شکل۸) نتایج دقیقاً مشابه با رقم مروارید نشان داد و بیشترین مقدار بیان ژن آسکوربات پراکسیداز در رقم گنبد نیز در تیمار کاربرد ۰/۵ میلی گرم دی کرومات پتاسیم بود که ۸/۰۳ برابر نسبت به شاهد افزایش بیان نشان داد. همان‌طور که در شکل۸ مشاهده می‌شود، بیان ژن آسکوربات پراکسیداز در لاین N9108 روند مشابه با دو رقم دیگر داشت (۹) و در تیمار کاربرد ۰/۵ میلی‌گرم دی کرومات پتاسیم بیشترین افزایش بیان را نسبت به شاهد (۹/۱٤ برابر نسبت به شاهد) داشت با این تفاوت که بر خلاف دو رقم دیگر اختلاف آن با مقدار بیان این ژن در تیمار کاربرد ۱/۵ میلی‌گرم دی کرومات پتاسیم که افزایش ۷/۹ برابری نسبت به شاهد داشت، در سطح احتمال ۵ درصد آزمون LSD معنی‌دار نشد.

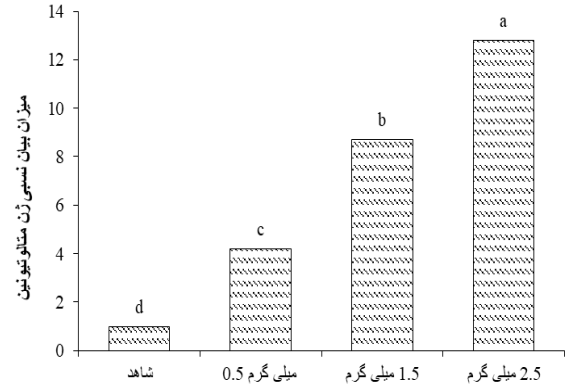
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-17]



شکل ۷- میزان بیان نسبی ژن آسکوربات پراکسیداز تحت غلظت‌های مختلف تنش دی کرومات پتاسیم در رقم مروارید گندم



شکل ۸- میزان بیان نسبی ژن آسکوربات پراکسیداز تحت غلظت‌های مختلف تنش دی کرومات پتاسیم در رقم گنبد گندم



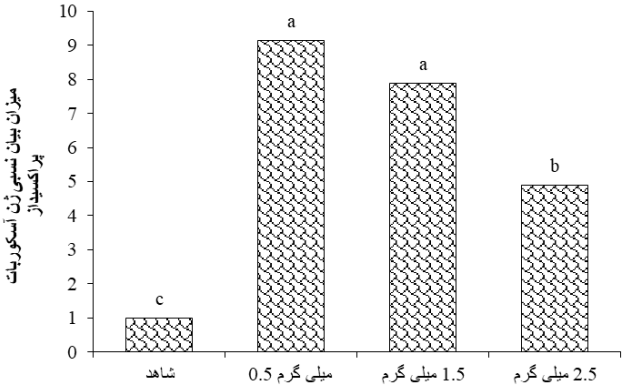
شکل ۹- میزان بیان نسبی ژن آسکوربات پراکسیداز تحت غلظت‌های مختلف تنش دی کرومات پتاسیم در لاین N9801 گندم

کاهش مقدار فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز تحت تأثیر مقادیر بالای کروم در نتایج سایر محققین نیز گزارش شده است که روند مشابه با آنزیم کاتالاز نشان داده و با نتایج این تحقیق همسو می باشد (Islam et al .2014؛ Saddiqeet al. 2015). در همین راستا (Amalia et al. (2016، طی پژوهشی بر روی گیاه موز بیان داشتند مقدار بیان ژن کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز تا غلظت ۲۰۰ppm افزایش بیان نشان داد که این افزایش بیان در ریشه‌ها بیشتر از اندام هوایی بود و علت آن را تقابل مستقیم کروم با ریشه‌ها بیان داشتند.

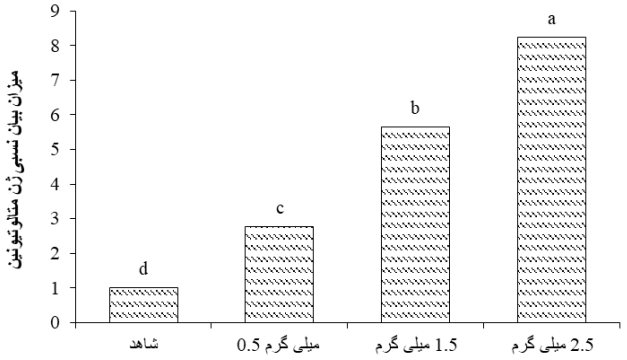
بیان ژن متالوتیونین

نتایج مقایسه میانگین بیان ژن متالوتیونین تحت تیمار دی کرومات پتاسیم نشان داد (شکل۱۰) بیان ژن متالوتیونین تحت تأثیر تنش ناشی از سمیت کروم افزایش یافت و بیشترین مقدار بیان این ژن در تیمار کاربرد ۲/۵ میلی‌گرم دی کرومات پتاسیم بود که بیان آن ۱۲/۸ برابر نسبت به شرایط عدم کاربرد دی کرومات پتاسیم (شاهد) افزایش یافت. اختلاف بین تیمارها نیز در سطح احتمال ۵ درصد آزمون LSD معنی‌دار بود. همچنین بیان ژن متالوتیونین در رقم گنبد (شکل۱۱) شرایط مشابه با رقم مروارید داشت و در تیمار کاربرد ۲/۵ میلی‌گرم دی کروکات پتاسیم افزایش بیان ۸/۲٤ برابری نسبت به شاهد مشاهده گردید که اختلاف آن با سایر تیمارها در سطح احتمال ۵ درصد آزمون LSD معنی‌دار شد. مقایسه میانگین مقدار بیان ژن متالوتیونین در لاین N9108 در شرایط استفاده از دی کرومات پتاسیم نشان داد (شکل ۱۲) بیان این ژن در شرایط کاربرد ۰/۵ میلی‌گرم دی کرومات پتاسیم ۳/۸۷ نسبت به شاهد افزایش یافت که اختلاف بین آن‌ها در سطح احتمال ۵ درصد آزمون LSD معنی‌دار شد. اما با افزایش مقدار دی کرومات پتاسیم به ۱/۵ میلی‌گرم بیان این ژن کمی کاهش یافت (۳/٦ برابر نسبت به شاهد) ولی با این وجود اختلاف آن با شاهد در سطح احتمال ۵ درصد آزمون LSD معنی‌دار شد و با تیمار ۰/۵ میلی‌گرم دی کرومات پتاسیم معنی دار نشد. کرومات پتاسیم بود که بیان آن ۵ برابر نسبت به شرایط عدم کاربرد دی کرومات پتاسیم (شاهد) افزایش یافت. همچنین بیشترین مقدار بیان این ژن در لاین N9108 نسبت به شاهد همانند دو رقم دیگر در شرایط کاربرد ۲/۵ میلی‌گرم دی در همین راستا Jian et al (2016) گزارش کردند مقدار بیان ژن متالوتیونین در نیشکر تحت تأثیر کاربرد کروم نسبت به شاهد (عدم کاربرد کروم) افزایش یافت.

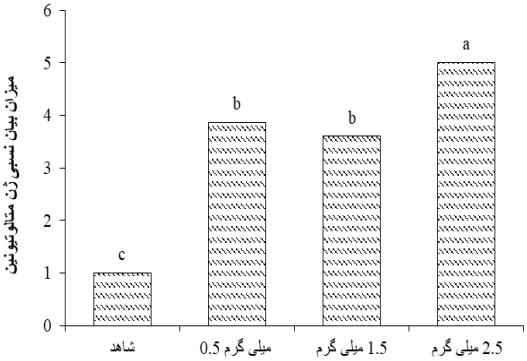
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-17]



شکل ۱۰- میزان بیان نسبی ژن متالوتیونین تحت غلظت‌های مختلف دی کرومات پتاسیم در رقم مروارید گندم



شکل ۱۱- میزان بیان نسبی ژن متالوتیونین تحت غلظت‌های مختلف تنش دی کرومات پتاسیم در رقم گنبد گندم



شکل ۱۲- میزان بیان نسبی ژن متالوتیونین تحت غلظت‌های مختلف تنش دی کرومات پتاسیم در لاین N9801 گندم

نتیجه‌گیری کلی

به‌طور کلی، نتایج این پژوهش نشان داد که به‌کارگیری کروم باعث افزایش اکسیداسیون سلولی شد. همچنین، با افزایش غلظت کروم، میزان اکسیداسیون سلولی به‌طور قابل توجهی افزایش پیدا کرد.یکی از پاسخ های عمومی به گستره وسیعی از تنش‌های زیستی وغیر زیستی، تولید گونه‌های فعال اکسیژن یا ROS است. آن ها بیان داشتند افزایش غلظت کروم با ایجاد سمیت در گیاه موجب افزایش پراکسیداسیون سلولی و فعالیت رادیکال‌های آزاد اکسیژن شده و این سیگنال دهی موجب افزایش بیان ژن متالوتیونین شده است.

فلزات سنگین باعث تولید ROS در سلول‌ها می‌شوند که این پدیده پاسخی به تنش محسوب می‌شود. کروم فلزی سنگین و سمی است که می‌تواند گونه‌های ROS از قبیل H_2O_2، O2- و OH- تولید کند که باعث آسیب اکسیداتیو به گیاهان می‌شوند. مقدار کلروفیل a و b نیز تحت تأثیر سمیت کروم در هر سه ژنوتیپ کاهش یافت. از جمله فرآیندهایی که تحت تأثیر تنش ناشی از فلزات سنگین قرار میگیرد فتوسنتز و رنگیزه‌های فتوسنتزی است. فلزات سنگین کاهش فتوسنتز را ممکن است از طریق آسیب به سازماندهی فراساختاری کلروپلاست، تغییر در متابولیت‌های فتوسنتزی، جایگزینی یون‌هایی مانند منیزیم و منگنز و غیره با سرب در کلروپلاست و ممانعت از ساختن یا تجزیه رنگیزه‌های فتوسنتزی القاء کنند منبع؟. ارزیابی مقدار بیان ژن‌ها تحت تنش دی کرومات پتاسیم نشان داد مقدار بیان ژن کاتالاز و متالوتیونین تحت تأثیر سمیت کروم نسبت به تیمار شاهد افزایش بیان داشت و با افزایش غلظت آن بیان این ژن‌ها افزایش بیشتری یافت. در رابطه با ژن آسکوربات پراکسیداز نتایج نشان داد در تیمار کاربرد ۰/۵ میلی‌گرم دی کرومات پتاسیم مقدار بیان این ژن بیشترین افزایش را داشت و با افزایش غلظت آن مقدار بیان این ژن کاهش یافت+؟؟ ولی مقدار آن بیشتر از تیمار شاهد بود. به‌طور کلی نتایج حاکی از این بود رقم مروارید و لاین N9108 شرایط بهتری از نظر کلیه صفات نسبت به رقم گنبد داشتند و بر اساس نتایج این تحقیق می‌توان بیان نمود این ژنوتیپ ها متحمل به تنش فلز کروم بوده که می‌توان پس از انجام سایر آزمایش‌های تکمیلی از آن‌ها در پروژه‌های اصلاحی بعدی به‌عنوان ارقام مطلوب در تحمل به تنش فلز کروم بهره برد و همچنین، با توجه به این که تولید آنتی‌اکسیدان‌ها یکی از مهم‌ترین مکانیزم‌های درون‌سلولی برای کاهش اثرات تنش در گیاهان است، به‌نظر

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-17]

می‌رسد تیمارهایی که قادر به تعدیل این مکانیزم و تحریک بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدان شوند، می‌توانند اثرات مثبتی بر روی گیاهانی که در مناطق آلوده رشد می‌کنند، داشته باشند.

منابع

Amalia L, Widiyanto T, Widiyanto SNB(2016) Catalase (CAT) and Ascorbate Peroxidase (APX) Genes Expression Level in Growth of Banana Plantlets (*Musa acuminata*) cv. Ambon Lumut Under Chromium Stress Condition. Journal of Plant Sciences 11(4): 69-74.

Asada K (2000) The water-water cycle as alternative photon and electron sinks. Phill Trans R Soc Lond B 355:1419-1431.

Bahrami A, Khorasani R, Taheri M, et al. (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.

Chance B, Maehly AC (1979) Assay of catalases and peroxidase. Methods in Enzymology2: 64–775.

El-Bassam N (1978) Spurendemente: nahrstoffe und gift zugleich. Kali-Briefe (Büntehof) 14: 255-272.

Farzaneh A (2001) Evaluation of the response to salinity stress in some wheat cultivars. Eway No Publications (in Persian).

Feng R, Zhao P, Zhu Y, et al. (2021) Application of inorganic selenium to reduce accumulation and toxicity of heavy metals (metalloids) in plants: The main mechanisms, concerns, and risks. Science of the Total Environment, 771, 144776.

Foyer CH, Lelandais M, Kunerk KJ (1994) Oxidative stress in plants. Physiology Plant 92: 696-717.

Gosh M, Singh S (2005) Comparative uptake and pytoextraction study of soil induced chromium by accumulator and high biomass weed species. Applied Ecology and Environmental Research 3(2) :67-69.

Goyer RA, Clarkson TW (2001) Casarret and boulls toxicology. The Basic Sciences of Poisons 826-830.

Hosseini Z, Pourakbar L (2013) Investigation of interaction between zinc and organic acid (malic acid, citric acid) on antioxidant responses in *Zea mays L*. Iranian Journal of Plant Biology 5(16): 1-12 (in Persian).

Hu J, Chen G, Irene M (2005) Removal and recovery of Cr VI from wastewater by maghemite nanoparticles. Waters Research 39: 4528-4536.

Hagege D, Nouvelot A, Boucard J, et al. (1990) Malondialdehyde titration with thiobarbiturate in plant extracts: avoidance of pigment interference. Phytochemical Analysis (1): 86-89.

HuangY, Tao S (2004) Influences of excessive Cu on photosynthesis and growth in ectomycorrhizal Pinus sylvestris seedlings. Journal of Environmental Sciences 16(3): 414419.

Isarankura P, Isarankura CH, Kasikun K, et al. (2009) Proteomic profiling of Escherichia Coli in response to heavy metals stress. European Journal of Oral Sciences 679 -688.

Islam MK, Salma Khanam M, Lee SY, et al .(2014) The interaction of arsenic (As) and chromium (Cr) influences growth and antioxidant status in tossa jute (*Corchorus olitorius*). Plant Omics Journal 7(6):499-509.

Jian R, Singh SP, Singh A, et al. (2016) Study on physio-biochemical attributes and metallothionein gene expression affected by chromium (VI) in sugarcane (spp. hybrid). Journal of Environmental Biology 37: 375-382.

Khatib M, Rashed Mohasel M, Ganjali, A. and Lahouti M, The effects of different nickel concentrations on some morpho-physiological characteristics of parsley (*petroselinum crispum*), Iranian journal of field crops research 2: 295-302., 2008.

Koocheki, Ahmadi, M., and V A., Zand, A., Bannayan, M., RezvaniMoghaddam, P., MahdaviDamghani, A., Jami Al-esal, S.R. 2005. Plant Ecophysiology. Mashhad University Press. 445p.

Lanfranco L, Bolchi A, Ros EC, et al. (2002) Differential expression of a metallothionein gene during the presymbiotic versus the symbiotic phase of an arbuscular mycorrhizal fungus. Plant Physiology 130(1): 58-67.

Lajem Orak Remecheri A, Armand N, Haji Hashemi S, et al. (2021) The effect of heavy element contamination of the soil around the refinery on growth characteristics, photosynthesis and proline of Vigna radiata L. Plant Research Journal (Iranian Biology Journal) (Scientific), 34(4), 1060-1046.

Marchiol L, Assolari S, Sacco P, et al. (2004) Phytoextraction of heavy metals by.

Pallet KE, Young AJ (1993) Carotenoids. In: Antioxidants in higher plants (eds. Alscher, R. G. and Hess, J. L.) 59-89. CRC Press, Boca Raton.

Panda SK, Khan MH (2003) Antioxidant efficiency in rice (*Oryza sativa L.*) leaves under heavy metal toxicity. Plant Biology 30: 23-29.

Perales-Vel HV, Pena-Castro JM, Canizares-Villanueva RO (2006) Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. Chemosphere 64(1): 1-10.

Pereira SC, Oliveira P F, Oliveira SR, et al. (2021) Impact of environmental and lifestyle use of chromium on male fertility: focus on antioxidant activity and oxidative stress. Antioxidants, 10(9), 1365.

Pfaffl MW, Horgan GW, 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.

Prasad M, Strzalka K (2002) Physiology and biochemistry of metal toxicity and tolerance in plants. Springer 432.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-17]

province. Seedling and Seed Breeding Journal 30: 305-325.

Reddy AM, Kumar SG, Jyothsnakumari G, et al. (2005) Lead induced changes in antioxidant metabolism of horsegram (Macrotyloma uniflorum (Lam.) Verdc. and bengalgram (*Cicer arietinum L.*). Chemosphere 60(1): 97-104.

Saddiqe Z, Farooq A, Khan F, et al. (2015) Effect of Chromium (VI) on physical growth and biochemical parameters ofWheat (*Triticum aestivum L.*) seedlings. Biologia 61(2): 219-226.

Sandalio LM, Dalurz HC, Gomez M, et al. (2001) Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. Journal of Experimental Botany 52(364): 2115-2126.

Seyed Rahmani M, Mahdavi Kalate Arabi SA (2013) Evaluation of genetic diversity in spring bread wheat genotypes in response to salinity stress in the north of the

Smeets K, Ruytinx J, Semane B, et al. (2008) Cadmium-induced transcriptional and enzymatic alterations related to oxidative stress. Environmental and Experimental Botany 63(1), 1-8.

Tavakoli Zanyani F, Shabani L, Razavizadeh R (2013) Activation of defense responses under isothiocyanate stress in oilseed rape plantlets. Iranian Journal of Plant Biology 5(16): 81-92 (in Persian).

Van Assche F, Clijsters H (1990) Effects of metals on enzyme activity in plants. Plant, Cell & Environment, 13(3): 195-206.

William Philip L, James Robert C, Roberts Stephen M (2000) Principles of Toxicology. Environmental and Industrial application. John Wiley & Sons Inc. 2 nd ed??? 325-433.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-17]