# اثر غلظت‌های مختلف آرسنیک و فسفر بر محتوی اسمولیت‌های بخش هوایی گیاه *Isatis cappadocica*

**ناصر کریمی* و زهرا سوری**

**گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی کرمانشاه**

**(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۲/۱۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۶/۱۰).**

**چکیده:**

**شبه فلز آرسنیک یکی از مهم‌ترین ترکیبات آلوده کننده‌ی محیط زیست محسوب می‌شود. برخی از گیاهان با انباشت غلظت‌های بالای آرسنیک در بخش‌های هوایی خود، توانایی پالایش مناطق آلوده به آرسنیک را دارند. با توجه به این که مطالعات قبلی توان بیش انباشت آرسنیک را در گیاه *Isatis cappadocica* ثابت کرده است، بذرهای این گیاه از مناطق آلوده جهت بررسی محتوی اسمولیت‌های بخش هوایی و فهم بهتر مکانیسم‌های مقاومتی گیاه در اثر متقابل بین فسفر و آرسنیک، انتخاب گردید. بدین منظور غلظت‌های مختلف آرسنیک (۰، ۵۰، ۲۰۰، ۸۰۰ و ۱۲۰۰ میکرومولار) و فسفر (۵، ۵۰، ۲۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میکرومولار) در شرایط کشت گلدانی، در مرحله‌ی ۴ برگی بر گیاه *I. cappadocica* اثر داده و محتوی اسمولیت‌های بخش هوایی و میزان آرسنیک تجمع یافته در گیاه اندازه‌گیری شد. بیشترین میزان آرسنیک تجمع یافته در تیمار ۱۲۰۰ میکرومولار آرسنیک و ۵ میکرومولار فسفر مشاهده گردید. به دنبال افزایش سطوح آرسنیک، محتوی اسمولیت‌ها (قندهای محلول، پرولین و پروتئین) افزایش یافت. انباشت بیش از ۷۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم آرسنیک (بر پایه‌ی وزن خشک) در بخش هوایی، نشان دهنده‌ی مقاومت بالای گیاه نسبت به آرسنیک و وجود مکانیسم‌های کارآمد ازجمله تجمع اسمولیت‌ها در آن به منظور سمیت زدایی آرسنیک می‌باشد.**

**کلمات کلیدی: آرسنیک، اسمولیت‌ها، بیش انباشت، فسفر، *I. cappadocica***

**مقدمه:**

آرسنیک به عنوان یک شبه فلز سمی به وسیله‌ی منابع طبیعی (آتشفشان‌ها) و منابع مصنوعی (علف‌کش‌ها و حشره کش‌ها) در طبیعت تولید می‌گردد (Meharg and Macnair, 1992 ). انسان از طریق فعالیت های معدن کاری در مناطق آلوده و مصرف آب آشامیدنی و مواد غذایی آلوده به آرسنیک در معرض این سم خطرناک قرار می‌گیرد (Zhao *et al*., 2009). اگرچه آلودگی آرسنیک بیشتر متعلق به کشورهای جنوب شرقی آسیا می‌باشد ولی در مناطقی از ایران (استان‌های کردستان و خراسان) نیز آلودگی خاک و آب به این آلاینده گزارش شده است (Karimi *et al*., 2010). آرسنیک و فسفر هردو متعلق به گروه پانزده جدول تناوبی عناصر شیمیایی هستند که به دلیل خصوصیات شیمیایی مشابه، رفتار مشابهی در خاک و گیاهان دارند (Lihong and Guilan, 2009). آرسنات به عنوان آنالوگ فسفات به وسیله سیستم انتقال دهنده فسفات

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی:nkarimi@razi.ac.ir

در گیاه، جذب می‌شود (Meharg and Macnair, 1992). بررسی دقیق اثر متقابل فسفر و آرسنیک بر جذب و انتقال آنها در گیاهان می‌تواند اطلاعات مفیدی را در مورد مکانیسم‌های سازگاری و مقاومت گیاهان به غلظت‌های مختلف آرسنیک فراهم کند. گیاهان برای مقابله با اختلالات فیزیولوژیکی و کمبود آب ناشی از تنش (آرسنیک)، سنتز و تجمع مواد آلی مانند پرولین، قندهای محلول و اسیدهای آمینه‌ی آزاد را افزایش داده و پتانسیل اسمزی را منفی می‌کنند، به این ترتیب تداوم جریان آب و فشار تورگر برای انجام فرایندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی حفظ می‌شود (Verma and Dubey, 2001). اسمولیت‌ها جذب و نگهداری آب را آسان‌تر کرده و در پایدار کردن ساختار ماکرو مولکول‌ها، پروتئین‌ها، غشاها و کلروپلاست‌ها در برابر تخریب القا شده در اثر تنش مؤثر هستند (Farouk, 2011). دلایلی مثل تجزیه‌ی پلی ساکاریدهایی مانند نشاسته، سنتز قندها از مسیر غیر فتوسنتزی، عدم تبدیل محصولات فتوسنتزی به یکدیگر، کاهش انتقال مواد از برگ‌ها به سایر اندام‌ها و متوقف شدن رشد، محتوی قندهای محلول را در شرایط تنش فلزات سنگین افزایش می‌دهد (Shah and Dubey, 1998). از سوی دیگر متابولیسم اسیدهای آمینه در مقاومت گیاهان به تنش‌ها نقش محوری را ایفا می‌کنند. به دلیل آن که پرولین در قسمت رأسی و منطقه‌ی طویل شدگی ریشه سنتز شده و از طریق تعرق به بخش هوایی منتقل می‌شود، از این رو میزان تجمع آن در برگ‌ها بیشتر است (Verslues and Sharp, 1999). این اسید آمینه در گیاهان تحت شرایط نامناسب رشد، از جمله تنش فلزات سنگین تجمع می‌یابد. بین تجمع پرولین و کمبود آب ایجاد شده در اثر حضور فلز سنگین ارتباط ویژه‌ای وجود دارد (Metwally *et al*., 2003). از سوی دیگر کاهش تنش اکسیداتیو القاء شده توسط آرسنیک در گیاهان می‌تواند به علت افزایش سنتز پروتئین‌ها و آنزیم هایی باشد که نقش مهمی در نگه داشتن تعادل فلز و دفع سمیت در سلول‌ها، دارند (Mishra and Dubey., 2006).

بسیاری از محققین با مطالعه‌ی تجمع پروتئین تحت اثر تنش فلزات سنگین در گیاهان دریافتند که تعداد هستک های درون هسته در پاسخ به تنش افزایش می‌یابد و موجب سنتز پروتئین‌های مقاوم در برابر فلزات سنگین می‌شوند (Madhava Rao and Stresty, 2000). پاک سازی مواد آلاینده از اکوسیستم‌ها به وسیله گیاهان را، گیاه پالایی (Phytoremidation) می‌نامند (Meagher, 2000). امروزه در فرایند گیاه پالایی، گیاهان بیش انباشت گری که می توانند مقدار زیادی از آلاینده را در اندام هوایی خود انباشت کنند، بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. به دلیل اهمیت آلودگی آرسنیک در محیط زیست، مطالعات زیادی بر روی روش‌های پاک-سازی آرسنیک از طریق گیاهان صورت گرفته است که ابتدا توسط Ma و همکاران (۲۰۰۱)، سرخس *Pteris vittata* به عنوان بیش‌انباشتگر آرسنیک معرفی گردید و مکانیسم‌های بیش انباشت آرسنیک در این گیاه، مورد مطالعه قرار گرفت (Zhoa *et al*., 2009). تاکنون مطالعات نشان داده است که می‌توان از گیاه *P. vittata* به عنوان یک بیش‌انباشتگر مناسب برای بررسی مکانیسم رفتار جذب فسفر و آرسنیک استفاده کرد. Karimi و همکاران (۲۰۰۹)، گیاه *Isatis cappadocica* را به عنوان یک گیاه بیش‌انباشتگر آرسنیک معرفی کردند و تحت شرایط آزمایشگاهی نشان دادند که این گیاه به عنوان اولین بیش انباشتگر آرسنیک در گیاهان نهان دانه است، که می‌تواند غلظت بالایی از آرسنیک را در اندام های هوایی خود انباشت کند. این گیاه بومی غرب کشور ایران است و می‌تواند به عنوان یک گیاه بیش انباشتگر آرسینک در فرایند گیاه پالایی مناطق آلوده غرب کشور مورد استفاده قرار گیرد. لذا در این پژوهش، تغییرات محتوی اسمولیت‌ها به منظور درک بهتر مکانسیم‌های مقاومت گیاه *I. cappadocica* در شرایطی که اثر متقابل بین فسفر و آرسنیک بر این گیاه اثر داده شد، مقایسه گردید.

**مواد و روش‌ها:**

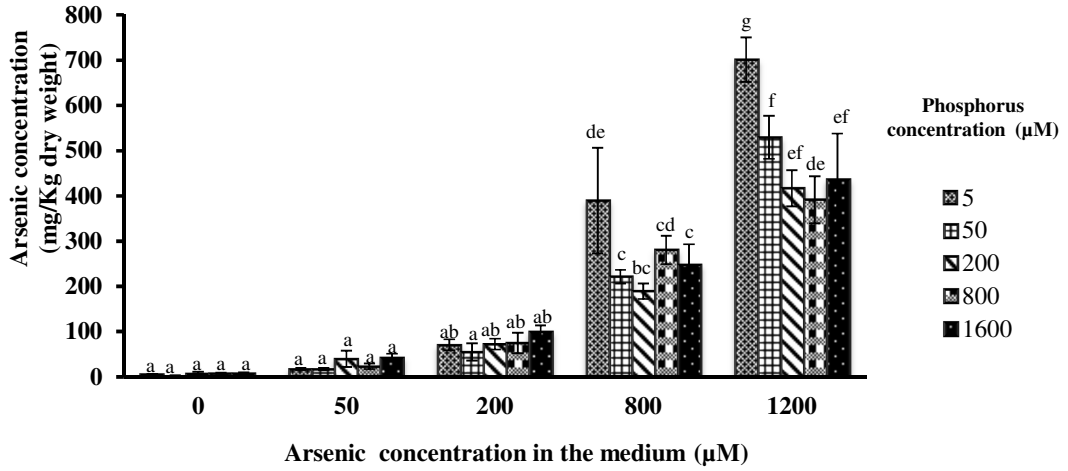
**کشت گلدانی:** بذرهای گیاه *I. cappadocica* از منطقه‌ی معدنی آلوده به آرسنیک زرشوران ایران واقع در ۳۵ کیلومتری شهرستان تکاب جمع آوری گردید. ابتدا بذرهای گیاه با سدیم هیپو کلرایت ۱٪ ضد عفونی و سپس با آب مقطر شستشو شدند. بذرهای استریل شده در داخل گلدان هایی که از قبل با پرلیت و ماسه به نسبت ۲ به ۱ پر شده قرار گرفت، سپس گلدان‌ها به گلخانه‌ی دانشگاه رازی، با شرایط محیطی نیمه کنترل شده شامل دمای متناوب ۱۸-۲۵ درجه‌ی سانتی گراد ( شب و روز)، رطوبت نسبی حدود ۴۵ درصد تناوب نوری ۱۶ ساعت نوری و ۸ ساعت تاریکی و شدت نوری حدود ۱۵۰ میکرو مول فوتون در متر مربع در ثانیه، انتقال داده شدند. بعد از جوانه زن ی، گلدان‌ها هر هفته ۲ بار با محلول غذایی تغییر یافته هوگلند ۵۰ درصد تغذیه شدند که ترکیب آن عبارت بود از: ۰/۵ میلی‌مولار $KNO_3$، ۰/۷۵ میلی‌مولار $Ca(NO_3)_2$، ۰/۲ میلی‌مولار $MgSO_4$، ۱۵ میکرومولار $H_3BO_3$، ۲ میکرومولار $MnCl_2$، ۱ میکرومولار $ZnSO_4$، ۰/۵ میکرو مولار $CuSO_4$، ۵۰ میکرومولار FeEDTA، ۰/۲ میکرومولار $NaMoO_4$.

پس از رسیدن به مرحله‌ی ۴ برگی، گلدان‌ها به گروه های ۳ گلدانی (هر تیمار، ۳ تکرار) تقسیم شدند و برای مدت ۴ هفته، هر هفته ۲ بار به آنها تیمارهای۰، ۵۰، ۲۰۰، ۸۰۰ و ۱۲۰۰ میکرو مولار آرسنات و ۵، ۵۰، ۲۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میکرو مولار فسفات اضافه شد. بعد از اتمام زمان تیمار، گیاهان از درون گلدان‌ها بیرون آورده شد و بخش هوایی آنها جدا و به منظور انجام مراحل بعدی، جمع آوری گردید.

**اندازه گیری محتوی پرولین:** برای اندازه گیری میزان پرولین آزاد بافت‌های گیاهی، از روش (Bates *et al*., 1973) استفاده گردید. به این ترتیب که به ۰/۱گرم از نمونه‌های برگی، ۱۰ میلی لیتر محلول ۳ درصد سولفوسالیسیلیک اسید اضافه گردید و پس از ۴۸ ساعت محلول صاف شد و برای اندازه گیری محتوی پرولین، مورد استفاده قرار گرفت. به ۱ میلی لیتر از محلول صاف شده فوق، ۱ میلی لیتر معرف ناین هیدرین و ۱ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال اضافه گردید. سپس به مدت ۱ ساعت در بن ماری جوشان (۱۰۰ درجه‌ی سانتی گراد) قرار داده شد. پس از سرد شدن، به محتوی هر لوله ۲ میلی لیتر تولوئن افزوده شد و محتویات لوله‌ها به خوبی مخلوط شدند. از دو فاز تشکیل شده‌ی اسید و تولوئن، محلول قرمز بالایی مورد نمونه‌برداری قرار گرفت و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر، مقدار جذب نمونه‌ها ثبت گردید.

**اندازه گیری محتوی قندهای محلول:** برای استخراج قند، ۰/۰۱ گرم از بافت خشک را با ۱۰ میلی لیتر آب مقطر گرم در هاون سائیده شد و با کمک کاغذ صافی واتمن صاف گردید. به منظور اندازه گیری قندهای محلول، از روش فنل – اسید سولفوریک استفاده شد. این روش بر اساس هیدرولیز قندهای محلول توسط اسید و ایجاد ترکیب فورفورال و در نهایت تشکیل کمپلکس رنگی ترکیب اخیر با فنل، استوار است. بدین صورت که ۲ میلی لیتر از عصاره‌ی گیاهی استخراج شده را با ۵۰ میکرو لیتر فنل ۸۰ درصد وزنی (حل شده در آب مقطر) مخلوط کرده و سپس ۵ میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ به آن اضافه گردید. این مخلوط به مدت ۲۰-۱۰ دقیقه در حمام آب گرم ۲۵- ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس جذب محلول توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در ۴۹۰ نانو متر خوانده شد و با کمک منحنی استاندارد مربوطه، محتوی هیدرات‌های کربن محلول محاسبه گردید (Dubois and Gilles, 1956).

**اندازه گیری محتوی پروتئین کل محلول:** برای اندازه گیری غلظت پروتئین از روش برادفورد استفاده شد (Bradford, 1976). جهت تهیه‌ی معرف، مقدار ۰/۰۵ گرم کوماسی بریانت بلو G250 در ۵۰ میلی لیتر اتانول ۹۶ درصد در تاریکی به خوبی حل گردیده و سپس ۲۵ میلی لیتر اسید فسفریک ۸۵ درصد را قطره قطره به مخلوط فوق




**شکل ۱- اثر غلظت‌های مختلف آرسنیک و فسفر بر میزان انباشت آرسنیک در بخش هوایی گیاه *I. cappadocica* حروف متفاوت هر ستون بیانگر معنی دار بودن اثر تیمارها بر میانگین انباشت آرسنیک در بخش هوایی گیاه، با استفاده از آزمون دانکن می‌باشد.**

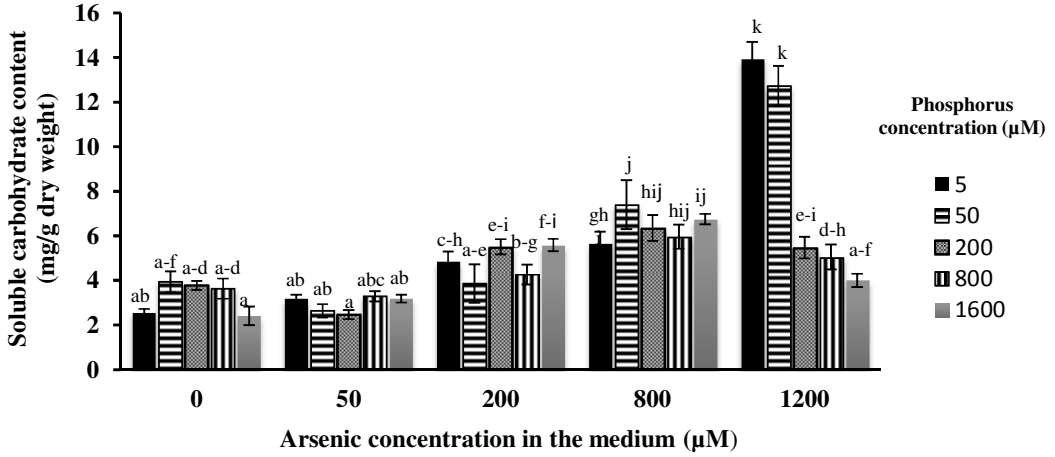
اضافه کرده و پس از هم زدن، حجم نهایی محلول با آب مقطر به حجم ۵۰۰ میلی لیتر رسید. برای اندازه گیری غلظت پروتئین هر نمونه ۵۰ میکرولیتر عصاره‌ی استخراج شده را در ۲/۵ میلی‌لیتر معرف کوماسی بلو تازه به آن افزوده و سپس میزان جذب نوری در طول موج ۵۹۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد.

**اندازه گیری میزان آرسنیک:** برای اندازه گیری غلظت آرسنیک کل در نمونه‌های گیاهی از روش Jardine و Meharg (۲۰۰۳) استفاده شد. به ۰/۲ گرم از نمونه‌های برگی، ۱ میلی لیتر اسید نیتریک غلیظ اضافه گردید. پس از نگهداری مخلوط حاصل به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق، ۱ میلی لیتر آب اکسیژنه اضافه شد. در مرحله بعد لوله‌های آزمایش در بن ماری با دمای ۷۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، به مدت نیم ساعت قرار گرفتند. سپس به دمای ۱۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، یک ساعت تا بخار شدن کل اسید نیتریک موجود در نمونه، منتقل شدند. پس از سرد شدن، محلول حاصل صاف گردید و با آب مقطر به حجم ۵۰ میلی لیتر رسید. سپس به ۱ میلی لیتر از محلول رقیق شده‌ی هر یک از نمونه‌ها ۵ میلی لیتر اسید کلردریک ۱۰ درصد، ۵ میلی لیتر ید ید پتاسیم ۱۰ درصد و ۵ میلی لیتر اسید آسکوربیک ۵ درصد اضافه گردید. در نهایت آرسنیک موجود در نمونه‌ها به وسیله‌ی دستگاه طیف سنج جذب اتمی (Shimadzu, 6200) به همراه تولید هیدرید (FIG 100) اندازه گیری شد.

**آنالیز آماری داده‌ها:** این پژوهش در قالب یک آزمایش فاکتوریل با طرح کاملاً تصادفی انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از مراحل مختلف این تحقیق با استفاده از نرم افزار آماری SPSS صورت گرفت. همچنین برای مقایسه‌ی میانگین‌ها، از آزمون دانکن استفاده گردید. نمودارها توسط نرم افزار Excel ترسیم شدند.

## نتایج:

**میزان انباشت آرسنیک در بخش هوایی، تحت اثر غلظت‌های مختلف آرسنیک و فسفر:** در تیمارهای اعمال شده، میزان آرسنیک تجمع یافته بین حداقل ۲/۰۹۶۵ (تیمار صفر میکرومولار آرسنیک، ۵۰ میکرومولار فسفر) و حداکثر ۷۰۰/۹۳۷ میلی گرم در کیلوگرم وزن خشک (تیمار ۱۲۰۰ میکرومولار آرسنیک و ۵ میکرومولار فسفر) متغیر بوده است. غلظت آرسنیک تجمع یافته در تیمارهای ۱۲۰۰ میکرومولار آرسنیک، افزایش معنی‌داری نسبت به سایر

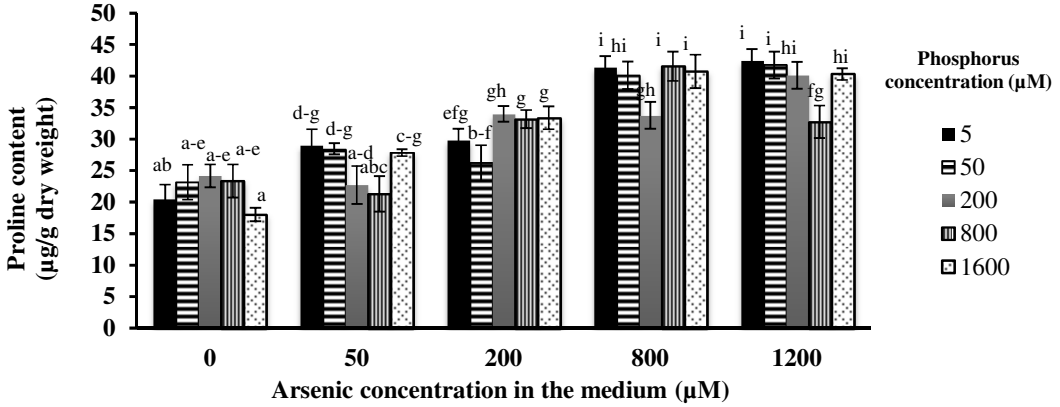



**شکل۲- اثر غلظت‌های مختلف آرسنیک و فسفر بر محتوی قندهای محلول بخش هوایی گیاه *I. cappadocica* حروف متفاوت هر ستون بیانگر معنی‌دار بودن اثر تیمارها بر میانگین قندهای محلول بخش هوایی گیاه، با استفاده از آزمون دانکن می‌باشد.**

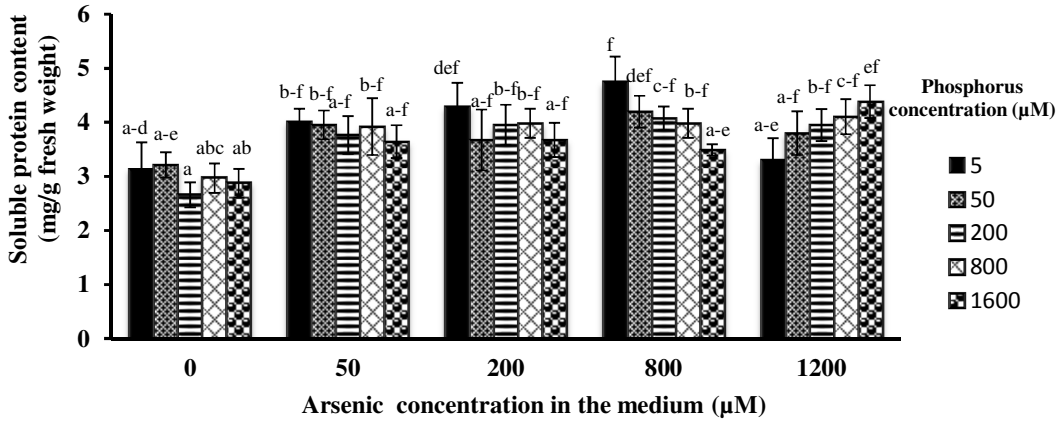
تیمارها داشت (شکل ۱). در سطوح پایین فسفر (۵ و ۵۰ میکرومولار) میزان آرسنیک تجمع یافته نسبت به سایر تیمارها بیشتر بوده ولی به دنبال افزایش سطوح فسفر، میزان تجمع آرسنیک کاهش یافته است.

**اثر غلظت‌های مختلف آرسنیک و فسفر بر محتوی قندهای محلول:** همان‌طور که در شکل ۲ ملاحظه می گردد، در تیمارهای ۱۲۰۰ میکرومولار آرسنیک، ۵ و ۵۰ میکرومولار فسفر، محتوی قندهای محلول به طور محسوسی نسبت به سایر تیمارها افزایش پیدا کرده است به نحوی که حدود ۵/۷ برابر کم‌ترین میزان، مربوط به تیمار صفر میکرومولار آرسنیک و ۱۶۰۰ میکرومولار فسفر می باشد. غلظت بالای آرسنیک در تیمار ۱۲۰۰ میکرومولار، محتوی نسبی قندهای محلول را در سطوح پایین فسفر، به میزان قابل توجهی افزایش داده و با افزایش سطوح فسفر در محیط (µM ۲۰۰≤) این روند به طرز معنی‌داری کاهش یافته است. البته این روند معنی داری در تیمارهای حاوی غلظت‌های کم آرسنیک (۰، ۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار آرسنیک) مشاهده نمی‌شود. به عبارتی غلظت‌های ۲۰۰ تا ۱۶۰۰ میکرومولار فسفر، با کاهش سمیت آرسنیک در بافت‌های گیاهی، به طور قابل توجهی میزان تولید کربوهیدرات‌های محلول را کاهش دادند. روند افزایشی تیمارهای ۱۲۰۰ میکرومولار آرسنیک همراه با سطوح پایین فسفر، احتمالاً به دلیل سمیت بالای آرسنیک می‌باشد و این افزایش محتوی قندهای محلول، می‌تواند مکانیسمی برای سمیت زدایی آرسنیک محسوب شود.

**اثر غلظت‌های مختلف آرسنیک و فسفر بر محتوی پرولین:** در گیاه *I. cappadocica* با افزایش سطوح آرسنیک در تیمارهای مختلف، محتوی پرولین به طور نسبی افزایش یافته است. در تیمارهای ۸۰۰ میکرومولار آرسنیک به همراه غلظت‌های ۵، ۵۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میکرو مولار فسفر و همچنین تیمارهای ۱۲۰۰ میکرومولار آرسنیک به همراه غلظت‌های ۵، ۵۰، ۲۰۰ و ۱۶۰۰ میکرو مولار فسفر نسبت به سایر تیمارها، روند افزایشی در محتوی پرولین مشاهده می‌گردد. برای مثال بیشترین میزان پرولین در تیمارهای ۸۰۰ میکرومولار آرسنیک، ۵، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میکرومولار فسفر و ۱۲۰۰ میکرومولار آرسنیک، ۵ و ۵۰ میکرومولار فسفر به ترتیب به مقدار ۴۱/۳۴۷۵، ۴۱/۵۵۲، ۴۰/۷۳۴، ۴۲/۳۷ و ۴۱/۷۵۶۵ میکروگرم برگرم وزن خشک اندازه گیری شد. از طرفی کم‌ترین میزان پرولین، مربوط به تیمار ۰ میکرومولار آرسنیک و ۱۶۰۰ میکرومولار فسفر است که محتوی پرولین در آن ۱۸/۰۳۴۵ میکروگرم بر گرم وزن خشک است (شکل ۳).




**شکل۳- اثر غلظت‌های مختلف آرسنیک و فسفر بر محتوی پرولین بخش هوایی گیاه *I. cappadocica*، حروف مشابه هر ستون بیانگر معنی‌دار نبودن اثر تیمارها بر میانگین پرولین بخش هوایی گیاه، با استفاده از آزمون دانکن می‌باشد.**




**شکل۴- اثر غلظت‌های مختلف آرسنیک و فسفر بر محتوی پروتئین کل بخش هوایی گیاه *I. cappadocica* حروف مشابه هر ستون بیانگر معنی‌دار نبودن اثر تیمارها بر میانگین محتوی پروتئین کل گیاه، با استفاده از آزمون دانکن می‌باشد.**

**اثر غلظت‌های مختلف آرسنیک و فسفر بر محتوی پروتئین کل:** محتوی پروتئین کل بخش هوایی بین حداقل ۲/۵۶ (تیمار صفر میکرومولار آرسنیک، ۲۰۰ میکرومولار فسفر) و حداکثر ۴/۷۵ میلی‌گرم برگرم وزن‌تر (تیمار ۸۰۰ میکرومولار آرسنیک و ۵ میکرومولار فسفر) متغیر بوده است. (شکل ۴). محتوی پروتئین به موازات افزایش سطوح آرسنیک در محیط افزایش پیدا کرده، ولی این افزایش در سطوح مختلف تنش آرسنیک به طور منظم صورت نگرفته است. بالاترین محتوی پروتئین مربوط به تیمار ۸۰۰ میکرومولار آرسنیک، ۵ میکرومولار فسفر بوده که به موازات افزایش سطوح فسفر کاهش یافته است. در آن سو افزایش سطوح فسفر در محیط توانست به طور نسبی باعث کاهش شدت تنش گردد. کاهش میزان پروتئین در تیمار ۱۲۰۰ میکرومولار آرسنیک، احتمالاً ناشی از شدت تنش اکسیداتیو و تخریب بیومولکول‌های پروتئینی و آنزیم‌ها می‌باشد.

**بحث:**

آرسنیک یک شبه فلز سمی و غیر ضروری برای گیاهان است که از طریق منابع طبیعی (فعالیت‌های زمین شناسی، آتشفشان‌ها) و منابع مصنوعی (استفاده از حشره‌کش‌ها، علف‌کش‌ها، فعالیت‌های معدن کاری و غیره) محیط زیست را آلوده می‌کند (Gunes *et al*., 2009).شکل غالب آرسنیک در خاک‌های هوازی، آرسنات است (Meharg and Macnair, 1992). اشکال قابل استفاده‌ی گیاهی آرسنیک (آرسنات و آرسنیت) می‌توانند در محلول خاک توسط گیاهان جذب شوند و به بخش هوایی، میوه‌ها و بذرهای گیاهان از طریق آبیاری با آب‌های آلوده، راه یابند (Kim *et al*., 2009). آرسنیک در گیاهان حساس به طور عمده در سیستم ریشه و به میزان کمتری در اندام‌های هوایی تجمع پیدا کرده و باعث ایجاد تغییرات فیزیولوژیک و آسیب در گیاهان می‌گردد (Marin *et al*., 1992). آرسنیک باعث اختلال در رشد طبیعی گیاه با علائم سمیتی نظیر کاهش وزن زنده، نکروز شدن جوانه‌های برگی، کاهش سطح فتوسنتز و غیره می‌گردد (Carbonell-Barrachina *et al*., 1998). به دلیل خصوصیات بیش‌انباشتگری گیاه *I. cappadocica*، تغییرات اسمولیت‌های بخش هوایی در این گیاه، تحت تیمارهای مختلف آرسنیک و فسفر مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان دهنده‌ی افزایش میزان آرسنیک انباشت شده در بخش هوایی به موازات افزایش سطوح آرسنیک در محیط است. در گیاهان مقاوم به آرسنیک علی رغم محتوی بالای آرسنیک در بخش هوایی، عوارض آشکاری از سمیت فلز در گیاه مشاهده نمی‌شود، که احتمالاً به دلیل سازش پذیری و وجود مکانیسم‌های مقاومتی از جمله تجمع اسمولیت‌ها می‌باشد. همان طورکه انتظار می‌رفت، گیاه بیش‌انباشتگر آرسنیک *I. cappadocica* در جذب آرسنیک بسیار کارآمد بود و بیش از ۷۰۰ میلی‌گرم بر کیلو گرم آرسنیک (بر پایه‌ی وزن خشک) را در بخش هوایی خود انباشت کرد، که این امر نشان دهنده‌ی مقاومت بالای این گیاه نسبت به آرسنیک و وجود مکانیسم‌های کارآمد در آن به منظور سمیت زدایی آرسنیک می‌باشد. علت وجود مقادیر کم آرسنیک در قسمت ریشه و بخش‌های هوایی گیاه در تیمارهای فاقد آرسنیک، نشان دهنده‌ی خطای آزمایش در مراحل مختلف شامل آبیاری، برداشت و عصاره گیری می‌باشد. مطالعات انجام شده بر روی گیاهانی مثل *Japanese mustard spinach* (Shaibur and Kawai, 2010) و گندم (Liu *et al*., 2005) نیز افزایش تجمع آرسنیک در بخش هوایی را گزارش کردند که با نتایج بدست آمده در این تحقیق همسو می‌باشد. در این مطالعه با افزایش سطوح آرسنیک در محیط، محتوی پرولین، قند های محلول و پروتئین کل در گیاه *I. cappadocica* روند افزایشی پیدا کرد. افزایش محتوی قندهای محلول احتمالاً مکانیسمی برای حفظ شرایط اسمزی مطلوب و حفاظت از غشاء و بیومولکول‌ها در مقابل تنش اکسیداتیو فراهم می کند (Choudhury *et al*., 2010). علاوه بر نقش قندها در تنظیم اسمزی، تصور می‌شود که گیاهان با افزایش قندهای محلول بتوانند ذخیره‌ی کربوهیدراتی خود را برای فرایند های متابولیکی و حفظ متابولیسم پایه سلول در شرایط تنش، در حد مطلوب نگه دارند. بر این اساس ذخیره‌ی مناسب قندهای محلول به گیاهان این امکان را می‌دهد که سوبسترای لازم را برای تنفس در شرایط تنش محیطی داشته باشند (Dubey and Singh, 1999). همچنین افزایش محتوی قندهای محلول در اثر بالا رفتن غلظت آرسنیک، به نگه داشتن آب سلول و بافت‌ها و نیز ممانعت از دهیدراته شدن کمک می‌کند. این موضوع با شکسته شدن ماکرومولکول‌های کربوهیدرات‌ها همراه می‌باشد که منجر به تشکیل قندهای محلول با وزن کمتر مانند سوکروز، گلوگز، فروکتوز و گالاکتوز می‌شود (Chun-xi *et al*., 2006). افزایش محتوی قندهای محلول در اثر تنش آرسنیک در گیاهانی مانند برنج (Choudhury *et al*., 2010)، بابونه (اسرار و فاضلیان، ۱۳۹۰) گزارش شده که در توافق با نتایج بدست آمده در این تحقیق است. روند افزایشی تیمارهای ۱۲۰۰

میکرومولار آرسنیک همراه با سطوح پایین فسفر، احتمالاً به دلیل سمیت بالای آرسنیک می‌باشد و این افزایش محتوی قندهای محلول، می‌تواند موجب حفظ وضعیت اسمزی سلول، پایداری غشاء و تأمین انرژی مورد نیاز گیاه *I. cappadocica* در شرایط کمبود فسفر شود. بر این اساس احتمالاً دلیل افزایش محتوی قندهای محلول تحت تنش آرسنیک در گیاه *I. cappadocica*، کاهش فتوسنتز و افزایش فعالیت آنزیم‌های تجزیه کننده‌ی قندهای غیرمحلول می‌باشد که منجر به کاهش مصرف قندها از یک سو و افزایش تولید آن‌ها از سوی دیگر شده است.

مقدار افزایش پرولین در شرایط تنش برای بسیاری از گونه‌های گیاهی، به میزان مقاومت آنها در برابر تنش بستگی دارد و غلظت پرولین در گیاهان مقاوم بیشتر از گیاهان حساس می‌باشد (Ashraf and Foolad, 2007). احتمالاً در طی تنش آرسنیک افزایش محتوی پرولین می تواند به دفع سمیت توسط کلات شدن فلز در سیتوپلاسم، کاهش جذب فلز (Wu *et al*., 1998)، کاهش آسیب به غشاء و حفاظت از آنزیم‌ها در مقابل واسرشته شدن و تثبیت سنتز پروتئین (Siriporndulsil *et al*., 2002) کمک کند. در تنش‌های گیاهی که حاصل اضافه کردن آرسنیک به محیط رشد گیاه می‌باشد، کاهش فعالیت آنزیم گلوتامات کیناز گزارش شده است. تنظیم آلوستریک این آنزیم از طریق محتوی پرولین صورت می‌گیرد و افزایش پرولین آزاد در طی تنش، باعث تجمع گلوتامات و ورود آن به مسیر سنتز گلوتاتیون و فیتوکلاتین می‌شود که این ترکیبات در سمیت زدایی آرسنیک نقش مهمی دارند (Milan Pavlik *et al*., 2010 ). به نظر می‌رسد که گیاه *I. cappadocica* با افزایش تجمع پرولین در بخش هوایی خود، قادر به مقابله با تنش اکسیداتیو در سطوح مختلف آرسنیک می‌باشد. همچنین مقادیر بالای پرولین با اثر تنظیمی منفی بر فعالیت آنزیم گلوتامات کیناز، موجب تجمع گلوتامات و به دنبال آن سنتز بیشتر ترکیبات آنتی اکسیدانی نظیر گلوتاتیون شده تا گیاه به مکانسیم‌های بیشتری جهت مقاومت به سطوح بالای آرسنیک، مجهز گردد. افزایش غلظت پرولین در اثر افزایش سطوح آرسنیک در *Shorea robusta* گزارش شده است (Pant *et al*., 2011) که با نتایج بدست آمده از این تحقیق همسو می‌باشد.

در این تحقیق محتوی پروتئین محلول گیاه *I. cappadocica* به موازات افزایش سطوح آرسنیک در محیط افزایش پیدا کرد. بالاترین محتوی پروتئین مربوط به تیمار ۸۰۰ میکرومولار آرسنیک، ۵ میکرومولار فسفر بود (شکل ۴). به نظر می‌رسد محتوی بالای پروتئین در این تیمار به علت افزایش تنش اکسیداتیو و القای آنزیم‌های آنتی اکسیدان و سایر پروتئین‌های دفاعی می‌باشد. کاهش میزان پروتئین کل در تیمار ۱۲۰۰ میکرومولار آرسنیک، احتمالاً ناشی از شدت تنش اکسیداتیو و تخریب بیو مولکول‌های پروتئینی و آنزیم‌ها می‌باشد. همچنین کاهش محتوی پروتئین در سطوح بالای آرسنیک می تواند به این دلیل باشد که گیاه برای مدت طولانی نمی‌تواند تعادل فلز را نگه دارد و در نتیجه‌ی افزایش فعالیت آنزیم‌های پروتئاز، روند تخریب پروتئین افزایش می‌یابد (Palma *et al*., 2002). در نتیجه‌ی شدت تنش اکسیداتیو و تولید انواع اکسیژن فعال و پراکسیداسیون لیپیدها، بافت گیاه آسیب دیده و در نهایت محتوی پروتئین کاهش می‌یابد (Karimi *et al*., 2009). به طور کلی استفاده از آنزیم‌های آنتی اکسیدان و کمپلکس های مختلف آرسنیک- پروتئین، از جمله مکانیسم‌هایی هستند که گونه‌ی گیاهی *I. cappadocica* جهت مقاومت به آرسنیک به کار می‌گیرد (Karimi *et al*., 2009). دلیل افزایش محتوی پروتئین در *I. cappadocica*، می تواند به دلیل افزایش آنزیم‌های آنتی اکسیدان و برخی از پروتئین های دفاعی نظیر گلوتاتیون به منظور مقابله با تنش اکسیداتیو ایجاد شده در گیاه باشد. از سوی دیگر کاهش محتوی پروتئین گیاه در تیمار ۱۲۰۰ میکرومولار آرسنیک به همراه سطوح پایین فسفر به علت شدت تنش اکسیداتیو و تخریب ساختار پروتئینی بسیاری از آنزیم‌ها و در طرف مقابل افزایش فعالیت آنزیم‌های پروتئاز در سطوح بالای

آرسنیک می‌باشد. همچنین افزایش محتوی پروتئین گیاه در تیمارهای ۱۲۰۰ میکرومولار آرسنیک، به موازات افزایش سطوح فسفر در محیط، احتمالاً مربوط به افزایش میزان برخی آنزیم‌ها و ترکیبات پروتئینی مانند گلوتاتیون و فیتوکلاتین می‌باشد. کاهش محتوی پروتئین در *Brasica juncea* که در آب‌های آلوده به فلزات سنگین رشد کرده بود، (Singh and Sinha, 2005) و افزایش پروتئین‌های محلول تحت تنش آرسنیک در برنج (Mishra and Dubey., 2006) همسو با نتایج بدست آمده از این پژوهش است.

## نتیجه‌گیری:

در این پژوهش با افزایش سطوح آرسنیک در محلول غذایی، محتوی اسمولیت‌ها (قندهای محلول، پرولین و پروتئین) در گیاه *I. cappadocica* افزایش یافت. محتوی بالای قندهای محلول گیاه، مکانیسمی برای حفظ شرایط اسمزی مطلوب و حفاظت از غشاء و بیومولکول‌ها در مقابل تنش اکسیداتیو است. افزایش محتوی پرولین در طی تنش آرسنیک می‌تواند باعث دفع سمیت توسط کلات شدن فلز در سیتوپلاسم، کاهش آسیب به غشاء و حفاظت از آنزیم‌ها در مقابل واسرشته شدن و تثبیت سنتز پروتئینگردد. همچنین محتوی بالای پرولین گیاه، موجب تنظیم وضعیت اسمزی، ممانعت از پراکسیداسیون لیپیدها و پاک‌سازی انواع گونه‌های اکسیژن فعال می‌شود. بنابراین گیاه *I. cappadocica* برای مقابله با اختلالات فیزیولوژیکی و کمبود آب ناشی از تنش (آرسنیک)، سنتز و تجمع مواد اسمولیت نظیر پرولین و قندهای محلول را افزایش داده و پتانسیل اسمزی را منفی می‌کند، به این ترتیب تداوم جریان آب و فشار تورگر برای انجام فرایند های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی حفظ می‌گردد.

## منابع:


فاضلیان، ن. اسرار، ز. (۱۳۹۰) تأثیر بر همکنش آرسنیک و سالیسیلیک اسید بر رشد و برخی از شاخص‌های فیزیولوژیک گیاه بابونه (*Matricaria rcutita* L.). زیست شناسی گیاهی ۱:۳-۱۱.

Ashraf, M. Foolad, M. R. (2007) Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. Environmental and Experimental Botany 59: 206-216.

Bates, L. S., Walderd, R. P. and Teare, I. D. (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant and Soil 39: 205-208.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Carbonell-Barrachina, A. A., Aarabi, M. A., Delaune, R. D., Gambrell, R. P. and Patrick, W. H. J. (1998) Arsenic in wetland vegetation: availability, phytotoxicity, uptake and effects on plant growth and nutrition. Science of the Total Environment 217: 189-199.

Choudhury, B., Mitra, S., Biswas, A. K. (2010) Regulation of sugar metabolism in rice seedling under arsenate toxicity and its improvement by phosphate. Physiology and Molecular Biology of Plants 16: 59-68.

Chun-xi, L., Shu-li, F., Yun, S. h., Li-na, J. and Xu-yang, H. (2006) Effects of arsenic on seed germination and physiological activities of wheat seedling . Journal of Environmental Sciences 19: 725-732.

Dubey, R. S. and Singh, A. K. (1999) Salinity induces accumulation of soluble sugars and alter the activity of sugar metabolizing enzymes in rice plant. Biologia Plantarum 53: 1147-1153.

Dubois, M. Gilles, K. A. Hamilton, J. K. Rebers, P. A. Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analyticcal Biochemistry 28: 350-356.

Farouk, S. (2011) Osmotic adjustment in wheat flag leaf in relation to flag leaf area and grain yield per plant. Journal of Stress Physiology and Biochemistry 7: 117-138.

Gunes, A., Pilbeam, D. J. and Inal, A. (2009) Effect of arsenic- phosphorus interaction on arsenic- induced oxidative stress in chickpea plants. Plant and Soil 314: 211-220.

Karimi, N., Ghaderian, S. M., Raab, A., Feldmann, J. and Meharg, A. A. (2009) An arsenic-accumulating, hypertolerant brassica, *Isatis cappadocica*. New Phytologist 184: 41- 47.

Karimi, N., Ghaderian, S. M., Marofi, H. and Schat, H. (2010) Analysis of arsenic in soil and vegetation of a contaminated area in Zarshuran, Iran,

Mishra, S. and Dubey, R. S. (2006) Inhibition of ribonuclease and protease activities in arsenic-exposed rice seedlings: role of proline as enzyme protectant. Plant Physiology 163:927-936.

Palma, J. M., Sandalio, L. M., Corpas, F. J., Romero-Puertas, M. C., McCarthy, I. and del Rio L. A. (2002) Plant proteases, protein degradation and oxidative stress: role of peroxisomes. Plant Physiology and Biochemistry 40: 521-530.

Pant, P. P., Tripathi, A. K. and Dwivedi, V. (2011) effect of heavy metals on some biochemical parameters of sal (*Shorea robusta*) seedling at nursery level, doon valley, India. Journal of Agricultural Science 2: 45-51.

Shah, K. and Dubey, R. S. (1998) Effect of cadmium on proline accumulation and ribonuclease activity in rice seedling: Role of proline as possible enzyme protectant. Biologia Plantarum 40: 121-130.

Shaibur, M. R. and Kawai, S. (2010) Effect of Arsenic on Nutritional Composition of Japanese *Mustard Spinach*: An effect of arsenic on nutritional quality of a green leafy vegetable. Nature and Science 8: 186-194.

Singh, S. and Shinha, S. (2005) Accumulation of metals and effects in Brassica juncea L. Czern. Grown on various amendments of tannery waste. Ecotoxicology and Environmental Safety 63:118-127.

Siriporndulsil, S., Traina, S., Verma, D. P. and Sayre, R. T. (2002) Molecular mechanism of proline mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. Plant Cell 14: 2837-47.

Verma, S. and Dubey R. S. (2001) Effects of cadmium on soluble sugars and enzymes of their metabolism in rice. Biologia Plantarum 1:117-123.

Verslues, P. E. and Sharp, R. E. (1999) Proline accumulation in Maize (*Zea mays*L.) primary roots at low water potentials. II. Metabolic source of increased proline deposition in the elongation zone. Plant Physiology 119: 1349-1360.

Wu, J. T., Hsieh, M. T. and Kow, L. C. (1998) Role of proline in response to toxic copper in *Chlorella sp*. (Chlorophyceae) cells. Journal of Phycology 31: 113-7.

Zhao, F. J., Ma, J. F., Meharg, A. A. and Mc Grath, S. P. (2009) Arsenic uptake and metabolism in plants. New Phytologist 181: 777-794.

identify two angiosperm arsenic hyperaccumulators. International Journal of Phytoremediation. 12: 159-173.

Kim, K. W., Bang, S., Zhu, Y., Meharg, A. A. and Bhattacharya, P. (2009) Arsenic geochemistry, transport mechanisms in the soil- plant system, human and animal health issues. Environment International 35: 453-454.

Lihong, W. and Guilan, D. (2009) Effect of external and internal phosphate status on arsenic toxicity and accumulation in rice seedlings. Journal of Environmental Sciences 21: 349- 351.

Liu, X., Zhang, S., Shan, X. and Zhu, Y. G. (2005) Toxicity of arsenate and arsenite on germination, seedling growth and amylolytic activity of wheat. Chemosphere 61: 293-301.

Ma, L. Q., Komar, K. M., Tu, C., Zhang, W., Cai, Y. and Kennelley, E. D. (2001) A fern that hyperaccumulates arsenic: a hardy, versatile, fast-growing plant helps to remove arsenic from contaminated soils. Nature 409-579.

Madhava Rao, K. V. and Stresty, T. V. S. (2000) Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. Plant Sciences 157: 113-128.

Marin, A. R., Masscheleyn, P. H. and Patrick, W. H. (1992) The influence of chemical form and concentration of arsenic on rice growth and tissue arsenic concentration. Plant and Soil 139: 175–183.

Meagher, R. B. (2000) Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. Plant Biology 3: 152- 162.

Meharg, A. A. and Jardine L. (2003) Arsenite transport into paddy rice (*Oryza sativa*) roots. New Phytologist 157: 39-44.

Meharg, A. A. and Macnair M. R. (1992) Genetic correlation between arsenate tolerance and the rate of arsenate and phosphate uptake in *Holcus lanatus* L. Heredity. 69: 336-341.

Metwally, A. Finkemeier, I. George, M. and Dietz, K. J. (2003) Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in borley seedling. Plant Physiology 132: 272-287.

Milan Pavlik, N., Pavli Kova, D., Staszkova, L., Neuberg, M., Kaliszova, R. and Tlustos, P. (2010) The effect of arsenic contamination on amino acids metabolism in *Spinacia oleracea* L. Ecotoxicology and Environmental Safety 73: 1309-1313.

# Effect of different arsenic and phosphorus concentrations on osmolytes contents of *Isatis cappadocica*

**Naser Karimi* and Zahra Souri**

**Department of Biology, Razi University, Kermanshah, Iran**

**(Received: 7 May 2013; Accepted: 1 September 2013)**

**Abstract**:

Metalloid arsenic is considered as one of the most important environmental contaminant compound. Some plant species can grow in arsenic contaminated soil capable of reducing arsenic toxicity. Nowadays, phytoremediation, as a new and friendly environmental technique employs the use of plants to remediate contaminated soil. Previous studies proved that *Isatis cappadocica* is an arsenic hyperaccumulator plant. Accordingly, we conducted this experiment to compare the interaction of arsenic and phosphorus on osmolytes content of *I. cappadocica* for better understanding of the mechanisms applied by this species. Therefore, the plants were grown for 6 weeks in a medium, embedded with combinations of 50, 200, 800 & 1200 µmol $l^{-1}$ arsenic and 5, 50, 200, 800 & 1600 µmol $l^{-1}$ phosphorus, respectively. The osmolytes content and the arsenic concentration of harvestable parts were determined. The highest concentration of arsenic was obtained in plants treated with 1200 µmol $l^{-1}$ As and 5 µmol $l^{-1}$ phosphorus. Increasing arsenic concentration in the medium led to increase of osmolytes (soluble sugars, proline and protein). The ability of Isatis to accumulate more than 700 mg $kg^{-1}$ arsenic in the shoots, illustrated the high resistance of this herb to arsenic and the existence of efficient mechanisms including accumulation of osmolytes.

**Key Words**: Accumulation, Arsenic, *I.cappadocica*, Osmolytes, Phosphorus.

* Corresponding Author: nkarimi@razi.ac.ir