

مقاله پژوهشی

ارزیابی پاسخ‌های فیزیولوژیکی و مولکولی دو رقم برنج به سمیت آرسنیک

سید رضا موسوی^۱، یوسف نیک‌نژاد^{۱*}، هرمز فلاح^۱، داوود براری تاری^۱^۱ گروه زراعت، دانشکده علوم کشاورزی، واحد آیت الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۹/۱۲/۰۴؛ تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۰/۰۳/۱۰)

چکیده

سمیت آرسنیک می‌تواند تهدیدی خطرناک برای کشاورزی پایدار و سلامت انسان باشد. به منظور بررسی اثر غلظت‌های مختلف آرسنیک بر صفت‌های فیزیولوژیکی و بیان ناقلینهای درگیر در انتقال آرسنیک و آهن در برنج رقم‌های طارم هاشمی و فجر، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی به صورت گلخانه‌ای در سال ۱۳۹۹ در دانشگاه آزاد اسلامی آیت الله آملی شهرستان آمل انجام شد. تیمارهای آرسنیک شامل صفر، ۲۵ و ۵۰ میکرومولار بودند. نتایج تحقیق نشان داد تنش آرسنیک با افزایش سطح بیان ژن‌های *Lsi1*، *Lsi2* و *Lsi6* باعث افزایش جذب و تجمع آرسنیک در ریشه و برگ هر دو رقم برنج شد. سمیت آرسنیک با تاثیر منفی بر بیان ناقلینهای درگیر در انتقال آهن به اندام هوایی، باعث کاهش تجمع آهن در برگ و در نتیجه کاهش رنگیزه‌های کلروفیل در هر دو رقم برنج شد. تنش آرسنیک با القای تجمع پراکسید هیدروژن و کاهش محتوای آسکوربیک اسید و گلوکاتینون باعث القای تنش اکسیداتیو و در نتیجه کاهش رشد در هر دو رقم برنج شد. با اینحال، فعالیت بیشتر آنزیم‌های آنتی اکسیدانت در رقم طارم هاشمی، باعث کاهش سطح پراکسید هیدروژن و مالون-دی‌آلدئید نسبت به رقم فجر بود. همچنین سطح بالاتر بیان ژن‌های *Lsi1*، *Lsi2*، *Lsi6*، *YSL2* و *FRDL1* در ریشه طارم هاشمی باعث جذب کمتر آرسنیک و تجمع بیشتر آهن در برگ نسبت به رقم فجر شد که در بهبود رشد طارم هاشمی تحت سمیت آرسنیک نقش مهمی دارد. یافته‌های تحقیق حاضر بیان کرد که برنج رقم طارم هاشمی با سیستم دفاعی قوی‌تر و تنظیم بیان ژن‌های درگیر در جذب و انتقال آرسنیک و آهن، تحمل بیشتری به آرسنیک نسبت به رقم فجر داشت.

کلمات کلیدی: آرسنیک، برنج، ناقلین آرسنیک، تنش اکسیداتیو، طارم هاشمی، فجر

مقدمه

محیطی نگرانی‌های زیادی را در جهت تولید محصولات پایدار ایجاد کرده است (Mishra et al., 2014). آرسنیک علاوه بر اثرات منفی بر رشد و عملکرد گیاهان، با ورود به زنجیره غذایی سلامت انسان را تهدید می‌کند. آرسنیت (As^{III}) و آرسنات (As^V) دو فرم غیرآلی غالب آرسنیک در محیط هستند. در شرایط غرقابی و بی‌هوای مزارع کشاورزی، فرم غالب آرسنیک به صورت آرسنیت می‌باشد. علاوه براین، بیشتر آرسنیک‌های جذب شده توسط ریشه گیاه احیا شده و به

گیاهان با تنش‌های مختلف محیطی روبرو می‌شوند و راهکارهای مختلفی برای مقابله با اثرات منفی تنش برای دستیابی به رشد و نمو بهتر بکار می‌گیرند که باعث سازگاری گیاه با شرایط نامطلوب محیطی می‌شود. تجمع فلز سمی آرسنیک در آب و خاک از طریق فعالیت‌های طبیعی و انسانی مانند استفاده از کودها و آفت‌کش‌های حاوی آرسنیک و آبیاری گیاهان با فاضلاب‌های صنعتی، به عنوان یک مشکل زیست

* نویسنده مسئول، نشانی پست الکترونیکی: yousofniknejad@gmail.com

باعث سازگاری متابولیکی گیاه برای تحمل سمیت ناشی از آرسنیک و در نتیجه بهبود رشد گیاه شد.

برنج غذای اصلی بیش از نیمی از جمعیت جهان (بیش از ۳ میلیارد نفر) است که حدود ۲۰ درصد پروتئین و ۲۷ درصد انرژی غذایی کشورهای در حال توسعه را تأمین می‌کند. این محصول مهم زراعی در منطقه‌ای نزدیک به ۶۰۰۰۰۰ هکتار عمدتاً در دو استان مازندران و گیلان در شمال ایران برای مدت زمان طولانی کشت می‌شود (Ghorbani et al., 2011). ارقام طارم محلی و فجر جزو محبوب‌ترین ارقام کیفی و کمی در استان مازندران می‌باشند که بیشترین سطح زیر کشت را به خود اختصاص داده‌اند (Ghorbani et al., 2009). بنابراین، در تحقیق حاضر تأثیر غلظت‌های مختلف آرسنیک بر رشد، صفات بیوشیمیایی و مولکولی دو رقم طارم هاشمی و فجر در شرایط گلخانه‌ای و به صورت هیدروپونیک مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

کشت و تیمار گیاهان: تحقیق حاضر در بهار ۱۳۹۹ در گلخانه دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آیت الله آملی، شهرستان آمل، استان مازندران به صورت طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل رقم برنج در دو سطح (طارم محلی و فجر) و تنش آرسنیک سه سطح (صفر، ۲۵ و ۵۰ میکرومولار) بودند. بذره‌ای هر دو رقم برنج از موسسه تحقیقات برنج کشور-معاونت آمل تهیه شد. بعد از ضدعفونی بذرها و خیساندن در آب شهری به مدت ۲۴ ساعت، بذرها در سینی‌های حاوی پیت‌موس اتوکلاو شده جوانه‌دار شدند. سپس، گیاهچه‌های ۱۰ روزه یک اندازه به گلدان‌های حاوی محلول هوگلند منتقل شدند. هر تیمار حاوی هشت گلدان بود. گلدان‌ها توسط پمپ آکوارיום هوا هوادهی می‌شدند. محلول هوگلند در pH 6.0 تنظیم شدند و هر هفته محلول داخل گلدان‌ها تعویض شدند. بعد از یک هفته انتقال گیاهچه‌ها به گلدان‌ها و سازگاری گیاهچه‌ها با شرایط هیدروپونیک، تیمارهای مختلف آرسنیک اعمال شد. تیمارهای آرسنیک با استفاده از آرسنیت

صورت آرسنیت تجمع می‌یابند (Kumar et al., 2015). دو ناقلین آرسنیت، Lsi1 و Lsi2 در گیاهان برنج شناسایی شدند که به ترتیب در بخش‌های آگزودرم و آندودرم قرار گرفته‌اند. ناقلین Lsi1 در جذب آرسنیت به داخل ریشه نقش دارد درحالی‌که ناقلین Lsi2 در انتقال آرسنیت به بخش‌های هوایی گیاه نقش دارد (Ma et al., 2008).

جذب آهن توسط گیاهان توسط دو راهکار I و II انجام می‌شود که استراتژی II خاص گیاهان غلات می‌باشد. گیاه برنج به عنوان یکی از گیاهان مهم خانواده غلات، آهن را با استفاده از ناقلین‌های YSL با ترشح موژنیک اسید (mugineic acid) و تشکیل کمپلکس آهن-موژنیک اسید جذب می‌کند (Kobayashi and Nishizawa, 2012). ناقلین‌های دیگر آهن که در جذب آهن-کلات توسط ریشه گیاه برنج نقش دارند شامل NRAMP5 و FRDL1 هستند. با اینحال، گیاه برنج می‌تواند یون آهن فرو (Fe^{2+}) را به طور مستقیم از خاک توسط ناقلین‌های منحصربفرد IRT1 جذب کند. نشان داده شده است که ناقلین‌های NRAMP همراه با آهن، یون‌های کادمیوم و منگنز را نیز در گیاه برنج منتقل می‌کنند (Ishimaru et al., 2012).

آرسنیت یکی از سمی‌ترین فرم‌های یون آرسنیک است که با اتصال به گروه‌های سولفیدریل باعث غیرفعال شدن پروتئین‌ها و آنزیم‌ها می‌شود. آرسنیک همچنین باعث تولید و تجمع انواع اکسیژن فعال و در نتیجه، القای تنش اکسیداتیو در گیاهان می‌شود، که باعث آسیب به ماکرومولکول‌های زیستی مانند DNA، پروتئین‌ها و لیپیدهای غشایی می‌شود (Petrov et al., 2015). گیاهان برای مقابله با اثرات مخرب انواع اکسیژن فعال دارای سیستم دفاعی شامل آنتی اکسیدانت‌های آنزیمی و غیرآنزیمی هستند. نشان داده شده است که فعالیت کارآمد آنتی اکسیدانت‌ها ناشی از تنوع ژنتیکی گونه‌های مختلف گیاهی همبستگی بالا با تحمل گیاه به تنش فلزات سنگین دارد (Gill, 2014). در گزارشی، Majumder و همکاران (۲۰۱۹) نشان دادند که رقم برنج مقاوم به آرسنیک با افزایش بیشتر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت نسبت به رقم حساس به آرسنیک

(NaAsO_2) آماده شدند. گلدان‌ها در دمای $22/25$ درجه سانتیگراد برای روز/شب، رطوبت $60-65$ درصد و 16 ساعت روشنایی با شدت نور $300-400$ میکرومول بر متر مربع بر ثانیه در گلخانه نگهداری شدند. 60 روز بعد از اعمال تنش آرسنیک، نمونه‌برداری انجام شد و بعد از ثبت ارتفاع بوته، نمونه‌ها برای اندازه‌گیری صفات بیوشیمیایی و مولکولی در فریزر -80 درجه سانتیگراد نگهداری شدند. برای اندازه‌گیری وزن خشک کل، نمونه‌ها 72 ساعت در دمای 75 درجه سانتیگراد خشکانده شدند و سپس وزن شدند (Ghorbani et al., 2019a).

رنگبره‌های فتوستنزی و فلورسانس کلروفیل: برای اندازه-

گیری رنگبره‌های کلروفیل a, b و کاروتنوئیدها، مقدار 0.5 گرم برگ تازه وزن و در هاون با پنج میلی‌لیتر استون 80 درصد به خوبی ساییده و سپس در 10000 دور به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ شدند. جذب محلول رویی در طول موج‌های 470 ، 645 و 663 نانومتر اندازه‌گیری شد و محتوای رنگبره‌های فتوستنزی مطابق روش Lichtenthaler (1987) محاسبه گردید. عملکرد فلورسانس کلروفیل (Fv/Fm) با استفاده از دستگاه فلورومتر (PAM 2500, Walz, Germany) و بعد از 20 دقیقه قرار گرفتن برگ در تاریکی با استفاده از گیره‌های مخصوص برگ (2030-B, Walz) اندازه‌گیری شدند.

غلظت عناصر آرسنیک و آهن: بافت‌های ریشه و برگ

بالغ گیاه برنج بعد از شستشو با آب مقطر، در دمای 68 درجه سانتیگراد به مدت 72 ساعت خشک شدند. بافت‌های خشک شده در محلول $\text{H}_2\text{O}_2:\text{HNO}_3$ (نسبت 4 به 1) هضم اسیدی شدند و سپس غلظت عناصر آرسنیک و آهن با استفاده از دستگاه ICP-MS (Agilent 7500 cx) اندازه‌گیری شد.

محتوای مالون دی آلدئید و پراکسید هیدروژن: اندازه-

گیری میزان پراکسیداسیون غشایی به وسیله تست تیوباریتوریک اسید (TBAT) با سنجش میزان مالون دی آلدئید مطابق روش Heath و Packer (1968) انجام گردید. مقدار پراکسید هیدروژن براساس واکنش H_2O_2 با یدور پتاسیم مطابق روش Alexieva و همکاران (2001) انجام شد.

فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت: برای تهیه عصاره

آنزیمی، بافت تازه برگ گیاه در بافر پتاسیم فسفات 50 میلی-مولار ($\text{pH } 7.5$) که حاوی پلی وینیل پیرولیدون یک درصد و EDTA یک میلی‌مولار بود، همگن شد. سپس عصاره‌ها به مدت 20 دقیقه با سرعت 5000 دور و در دمای چهار درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد و از محلول رویی برای سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت استفاده شد.

فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از محاسبه کاهش جذب

H_2O_2 در 240 نانومتر به مدت 30 ثانیه انجام شد. محلول واکنش شامل عصاره آنزیمی، بافر فسفات پتاسیم 50 میلی‌مولار ($\text{pH } 7.0$) و پراکسید هیدروژن 15 میلی‌مولار بود. فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با قرائت جذب محلول واکنش شامل عصاره آنزیمی، متیونین 13 میلی‌مولار، ریبوفلاوین 13 میکرومولار و نیتروبلو تترازولیوم 63 میکرومولار در طول موج 560 نانومتر مطابق روش Beauchamp و Fridovich (1971) محاسبه گردید. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز براساس روش Sairam و همکاران (2002) در محلول واکنش حاوی بافر فسفات 50 میلی‌مولار ($\text{pH } 7.0$)، آسکوربیک اسید 0.5 میلی‌مولار، EDTA 0.1 میلی‌مولار، آب اکسیژنه 25 میلی‌مولار و عصاره آنزیمی اندازه‌گیری شد. کاهش جذب در محلول واکنش به مدت یک دقیقه در طول موج 290 نانومتر اندازه-گیری شد. فعالیت پراکسیداز با برآورد افزایش در جذب مخلوط واکنش شامل عصاره آنزیمی، پراکسید هیدروژن 40 میلی‌مولار، گایاکول 20 میلی‌مولار و بافر فسفات پتاسیم 50 میلی‌مولار ($\text{pH } 5.0$) در طول موج 240 نانومتر به مدت 2 دقیقه محاسبه شد.

محتوای آسکوربیک اسید و گلوتاتیون: بعد از هموژن کردن

بافت تازه برگ گیاه با متافسفریک پنج درصد حاوی EDTA یک میلی‌مولار و سانتریفیوژ با سرعت 12000 دور به مدت 10 دقیقه، از محلول رویی برای اندازه‌گیری محتوای آسکوربیک اسید و گلوتاتیون استفاده شد. برای اندازه‌گیری آسکوربیک اسید، محلول رویی ابتدا با استفاده از بافر فسفات پتاسیم 0.5 مولار ($\text{pH } 7.0$) خنثی‌سازی شد. سپس، یک واحد آنزیم

جدول ۱. فهرست آغازگرهای اختصاصی استفاده شده در ریل تایم PCR

نام ژن	شماره دستیابی	5'-primer-3'
<i>OsLsi1</i>	XM_015770687	F: GTTGCTCAGGCTTCTCAACC R: AGTTGTTGCTGGCCATTCT
<i>OsLsi2</i>	XM_015776731	F: CTCGCTGCTCGTCTTCTTCT R: GGTACGTTTGATGCGAGGTT
<i>OsLsi6</i>	XM_015788648	F: GTCCGTTGATTGCTTGTCT R: TCACGAACACAAGCAGGAAC
<i>OsNramp1</i>	XM_015792143	F: TTGGACCAGGCTTTATGGTC R: CCCTGTCACCACTCCAAGAT
<i>OsNramp5</i>	XM_015789528	F: TCTTGGCCTCCAAAAATACG R: CAAGGCAGAATGCAAGAACA
<i>OsIRO2</i>	XR_001540192	F: CTTGAGGCGGACATCTTCTC R: AGAGCTCGTTGAGCTGCTTC
<i>OsFRDL1</i>	XM_015777404	F: AGCAGCCAAGATCTGGAGAA R: AGACCAGGAAGACAGCCTGA
<i>OsYSL2</i>	XM_015769926	F: AGAACACCGTTGTCCAGACC R: TAAGGAGCCCAACGAAGCTA
<i>OsActin</i>	XM_015774830	F: TCCTCCGTGGAGAAGAGCTA R: GCAATGCCAGGGAACATAGT

(جدول ۱). الگوی بیان ژنهای مورد مطالعه توسط qPCR با استفاده از کیت BIO-RAD (iQ Sybr Green Supermix) و دستگاه ترموسایکلر شرکت BIO-RAD انجام شد. ژن خانه‌دار بتا-اکتین به عنوان شاهد درون‌زاد در نظر گرفته شد. میزان بیان ژن با روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شدند. در این روش، همه داده‌ها با ژن بتا-اکتین به عنوان شاهد درون‌زاد نرمال شده و سپس میزان تغییرات بیان ژن‌ها در تیمارهای مختلف نسبت به شاهد سنجیده شد. **آنالیز داده‌ها:** تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین توسط آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح پنج درصد انجام شد. رسم نمودارها با Excel صورت گرفت. میانگین صفات مورفولوژی و بیوشیمیایی براساس چهار تکرار و میانگین بیان ژن‌ها براساس سه تکرار محاسبه شدند.

نتایج

صفات رشدی و رنگی‌های فتوسنتزی: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که در رقم طارم هاشمی، اثر آرسنیک بر ارتفاع گیاه و وزن خشک کل در سطح یک درصد و در رقم فجر بر ارتفاع در سطح پنج درصد و بر وزن خشک کل در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین نشان داد تیمار ۲۵ میکرومولار آرسنیک تاثیر معنی‌داری بر ارتفاع دو رقم برنج

آسکوربات پراکسیداز و بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH 7.0) به محلول اضافه شدند و با قرائت جذب محلول در ۲۶۵ نانومتر، آسکوربیک اسید کل و احیا شده تعیین شدند. محتوای آسکوربیک اسید اکسید شده با کم کردن آسکوربیک اسید احیا از میزان کل آسکوربیک اسید دست آمد (Dutilleul et al., 2003). از محلول واکنش شامل محلول رویی، NADPH ۰/۳ میلی‌مولار، ۵،۵- دی تیویس (۲-نیتروبنزوئیک اسید) ۶ میلی‌مولار و آنزیم گلوکاتایون ردوکتاز برای اندازه‌گیری گلوکاتایون کل استفاده شد. گلوکاتایون اکسید شده نیز بعد از آنکوبه کردن محلول واکنش حاوی محلول رویی، تری‌اتانول آمین ۵۰ درصد و ۲-وینیل پیریدین در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه، با قرائت میزان جذب در ۴۱۲ نانومتر محاسبه شد. با کم کردن گلوکاتایون اکسید شده از گلوکاتایون کل، محتوای گلوکاتایون احیا شده بدست آمد.

بررسی بیان ژن: استخراج RNA کل ریشه گیاه برنج با استفاده از محلول تریزول (Invitrogen, Carlsbad, CA) طبق دستورالعمل شرکت انجام شد و کمیت و کیفیت RNA براساس جذب نوری با دستگاه اسپکتروفتومتر و بررسی باندهای مربوطه در ژل الکتروفورز تعیین و تایید شد. بعد حذف DNA، سنتز cDNA با استفاده از کیت سنتز شرکت Invitrogen انجام و پرایمرهای اختصاصی طراحی شدند

جدول ۲- میانگین مربعات و مقایسه میانگین صفات مورفولوژی و رنگی‌های فتوسنتزی دو رقم برنج طارم هاشمی و فجر تحت تنش آرسنیک (صفر، ۲۵ و ۵۰ میکرومولار)

میانگین مربعات							
df	ارتفاع	وزن خشک کل	کلروفیل a	کلروفیل b	کاروتنوئیدها	فلورسانس کلروفیل (Fv/Fm)	
رقم طارم هاشمی							
تیمار	۲	۰/۸**	۰/۴**	۰/۹۹**	۰/۰۰۹**	۰/۰۴**	
خطا	۶	۱/۹	۰/۰۲	۰/۰۱	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۰۲	
ضریب تغییرات	۳/۴	۳/۲	۶/۵	۸/۵	۵/۱	۲/۵	
رقم فجر							
تیمار	۲	۱/۸**	۰/۸**	۱/۲**	۰/۰۰۶**	۰/۰۸**	
خطا	۶	۲/۸	۰/۰۲	۰/۰۱	۰/۰۰۰۴	۰/۰۰۰۳	
ضریب تغییرات (درصد)	۴/۹	۳/۵	۶/۹	۸/۷	۷/۵	۳/۵	
مقایسه میانگین							
رقم	آرسنیک (μM)	ارتفاع (سانتیمتر)	وزن خشک کل (گرم بر بوته)	کلروفیل a (میلی گرم بر وزن تر)	کلروفیل b	کاروتنوئیدها	فلورسانس کلروفیل (Fv/Fm)
طارم هاشمی	۰	۴۳/۹۸ ± ۰/۷۸ ^A	۴/۴۵ ± ۰/۰۸ ^A	۲/۲۸ ± ۰/۱۳ ^A	۱/۷۲ ± ۰/۱۴ ^A	۰/۲۵۲ ± ۰/۰۱۰ ^C	۰/۶۴۶ ± ۰/۰۱۳ ^A
	۲۵	۴۴/۱۲ ± ۱/۳۷ ^A	۴/۱۷ ± ۰/۱۶ ^B	۱/۹۲ ± ۰/۱۵ ^B	۱/۴۸ ± ۰/۰۹ ^B	۰/۲۸۳ ± ۰/۰۱۸ ^B	۰/۵۷۹ ± ۰/۰۱۵ ^B
	۵۰	۳۳/۹۶ ± ۱/۷۶ ^B	۳/۴۶ ± ۰/۱۳ ^C	۱/۵۵ ± ۰/۱۰ ^C	۰/۶۳ ± ۰/۱۰ ^C	۰/۳۵۶ ± ۰/۰۱۷ ^A	۰/۴۲۴ ± ۰/۰۱۳ ^C
فجر	۰	۳۵/۶۷ ± ۱/۷۴ ^a	۴/۶۵ ± ۰/۱۴ ^a	۲/۴۵ ± ۰/۱۲ ^a	۱/۸۰ ± ۰/۱۵ ^a	۰/۲۲۴ ± ۰/۰۱۲ ^b	۰/۶۷۵ ± ۰/۰۱۵ ^a
	۲۵	۳۶/۳۵ ± ۱/۸۸ ^a	۴/۲۲ ± ۰/۱۲ ^b	۱/۹۹ ± ۰/۱۶ ^b	۱/۵۶ ± ۰/۱۱ ^b	۰/۲۹۴ ± ۰/۰۲۲ ^a	۰/۵۱۸ ± ۰/۰۲۰ ^b
	۵۰	۳۰/۷۲ ± ۱/۳۳ ^b	۳/۱۶ ± ۰/۱۶ ^c	۱/۴۵ ± ۰/۱۳ ^c	۰/۶۰ ± ۰/۰۸ ^c	۰/۳۰۶ ± ۰/۰۲۵ ^a	۰/۳۷۵ ± ۰/۰۱۹ ^c

- * و ** به ترتیب معنی‌داری در سطح پنج و یک درصد، ns عدم اختلاف معنی‌دار.

- مقادیر با حروف کوچک یا بزرگ یکسان در هر ستون، فاقد اختلاف معنی‌دار آماری در سطح احتمال ۵ درصد براساس آزمون LSD هستند (n = 4 ± SD).

هاشمی به ترتیب به میزان ۶/۳ و ۲۸/۶ درصد و رقم فجر به میزان ۹/۳ و ۳۲ درصد نسبت به گیاهان شاهد شد (جدول ۲). آنالیز واریانس نشان داد که اثر تیمار در دو رقم برنج بر رنگی‌های فتوسنتزی و فلورسانس کلروفیل در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). مقایسه میانگین صفات نیز نشان داد افزایش غلظت آرسنیک باعث کاهش معنی‌دار محتوای کلروفیل a، b و فلورسانس کلروفیل در هر دو رقم

نداشت درحالی‌که تیمار ۵۰ میکرومولار آرسنیک به طور معنی‌داری باعث کاهش ارتفاع طارم هاشمی و فجر به ترتیب به میزان ۲۲/۸ و ۱۳/۹ درصد نسبت به شاهد شد (جدول ۲). روند کاهشی در وزن خشک کل دو رقم برنج با افزایش غلظت آرسنیک مشاهده شد که بیشترین کاهش در تیمار ۵۰ میکرومولار آرسنیک بدست آمد. تیمارهای ۲۵ و ۵۰ میکرومولار آرسنیک باعث کاهش وزن خشک رقم طارم

برنج شد و کمترین میزان محتوای کلروفیل‌ها و فلورسانس کلروفیل در گیاهان تیمار شده با آرسنیک ۵۰ میکرومولار ثبت گردید (جدول ۲). افزایش غلظت آرسنیک باعث افزایش محتوای کاروتنوئیدها در هر دو رقم برنج نسبت به تیمار شاهد شد و بیشترین افزایش در میزان کاروتنوئیدها تحت تیمار ۵۰ میکرومولار آرسنیک در دو رقم طارم هاشمی و فجر به ترتیب به میزان ۴۱/۳ و ۳۵ درصد نسبت به گیاهان شاهد مربوطه مشاهده شد (جدول ۲).

غلظت آرسنیک و آهن ریشه و برگ: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که در هر دو رقم، اثر تیمار بر غلظت آرسنیک برگ و آهن برگ و غلظت آهن و برگ در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). نتایج مقایسه میانگین نشان داد که تیمارهای آرسنیک باعث افزایش تجمع آرسنیک در ریشه و برگ هر دو رقم برنج شد و بیشترین غلظت آرسنیک تحت تیمار ۵۰ میکرومولار آرسنیک مشاهده شد. همچنین تحت تیمارهای مشابه آرسنیک، میزان تجمع آرسنیک در ریشه و برگ گیاه فجر بیشتر از رقم طارم هاشمی بود (جدول ۳). تیمار آرسنیک باعث افزایش تجمع آهن در ریشه هر دو رقم برنج نسبت به گیاهان شاهد شد و بیشترین تجمع در رقم‌های طارم هاشمی و فجر تحت تیمار ۵۰ میکرومولار آرسنیک به ترتیب به میزان ۷۶/۲ و ۷۲/۷ درصد افزایش نسبت به گیاهان شاهد ثبت گردید (جدول ۳). برخلاف ریشه، تجمع آهن در برگ هر دو رقم برنج با اعمال تنش آرسنیک روند کاهشی نشان داد و کمترین تجمع آهن تحت غلظت بالای آرسنیک مشاهده شد. تحت تیمارهای مشابه آرسنیک، غلظت آهن در برگ رقم طارم هاشمی بیشتر از رقم فجر بود (جدول ۳).

محتوای پراکسید هیدروژن، مالون دی آلدئید و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت: آنالیز واریانس نشان داد اثر تیمار در هر دو رقم برنج بر پراکسید هیدروژن و محتوای مالون دی آلدئید در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۴). مقایسه میانگین نشان داد روند افزایش در محتوای پراکسید هیدروژن برگ در هر دو رقم برنج مشاهده شد که بیشترین محتوای پراکسید هیدروژن در گیاهان تیمار شده با ۵۰ میکرومولار

آرسنیک ثبت شد. در هر دو سطح آرسنیک، محتوای پراکسید هیدروژن در رقم فجر به طور معنی‌داری بیشتر از رقم طارم هاشمی بود (شکل A۱). تیمارهای ۲۵ و ۵۰ میکرومولار آرسنیک باعث افزایش محتوای مالون دی آلدئید برگ در رقم طارم هاشمی به ترتیب به میزان ۵۳/۹ و ۱۲۵/۷ درصد و رقم فجر به میزان ۵۶ و ۱۲۶/۹ درصد نسبت به گیاهان شاهد مربوطه شد (شکل B۱).

اثر تیمار بر فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز در هر دو رقم برنج در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۴). مقایسه میانگین نیز نشان داده است که در رقم طارم هاشمی، افزایش غلظت آرسنیک باعث روند افزایشی در فعالیت آنزیم کاتالاز برگ شد و بالاترین فعالیت کاتالاز تحت تیمار ۵۰ میکرومولار آرسنیک ثبت شد. اما در رقم فجر، بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز تحت تیمار ۲۵ میکرومولار آرسنیک ثبت شد و افزایش بیشتر آرسنیک باعث کاهش فعالیت کاتالاز نسبت به تیمار ۲۵ میکرومولار آرسنیک شد (شکل A۲). فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز با افزایش غلظت آرسنیک افزایش معنی‌داری نسبت به گیاهان شاهد در هر دو رقم برنج نشان دادند و بالاترین فعالیت تحت تیمار ۵۰ میکرومولار آرسنیک بدست آمد. در سطوح مشابه آرسنیک، فعالیت دو آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز در رقم طارم هاشمی به طور معنی‌داری بیشتر از رقم فجر بود (شکل B۲، C). تیمار ۲۵ میکرومولار آرسنیک باعث افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در برگ هر دو رقم برنج نسبت به شاهد شد با اینحال، سطح فعالیت آنزیم پراکسیداز در فجر به طور معنی‌داری بیشتر از طارم هاشمی بود. تحت تیمار ۵۰ میکرومولار آرسنیک، فعالیت آنزیم پراکسیداز در طارم هاشمی افزایش بیشتر یافت و به بالاترین سطح فعالیت خود رسید درحالیکه، در فجر با کاهش معنی‌داری همراه شد بطوریکه کمترین فعالیت آنزیم پراکسیداز در برگ رقم فجر تیمار شده با ۵۰ میکرومولار آرسنیک به میزان ۲۳/۳ درصد کاهش نسبت به شاهد ثبت گردید (شکل D۲).

جدول ۳- میانگین مربعات و مقایسه میانگین تجمع آرسنیک و آهن در ریشه و برگ دو رقم برنج طارم هاشمی و فجر تحت تنش آرسنیک (صفر، ۲۵ و ۵۰ میکرومولار)

میانگین مربعات				
df	آرسنیک ریشه	آرسنیک برگ	آهن ریشه	آهن برگ
رقم طارم هاشمی				
تیمار	۱۶۹۴۳۶**	۱۳۲۶**	۵۵۸۱۷۷**	۳۲۷**
خطا	۲۰۳	۶/۹	۱۹۶	۲/۵
ضریب تغییرات	۵/۴	۱۰/۹	۲/۸	۳/۲
رقم فجر				
تیمار	۱۹۲۲۱۲**	۱۸۷۳**	۷۹۸۲۳**	۵۸۰**
خطا	۱۶۰	۲/۴	۱۶۷	۱/۷
ضریب تغییرات (درصد)	۴/۵	۵/۶	۲/۷	۲/۷

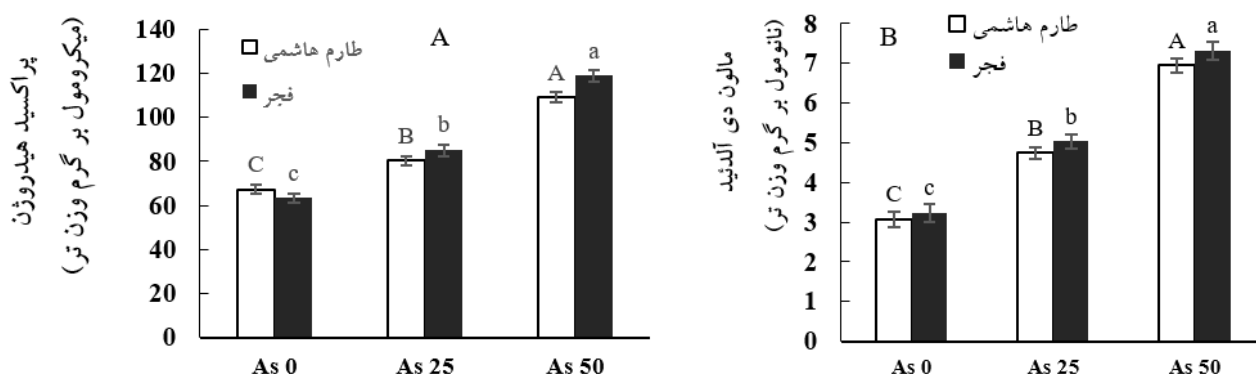
مقایسه میانگین				
رقم	آرسنیک	آرسنیک ریشه	آرسنیک برگ	آهن برگ
	(میکرومولار)	(میکروگرم بر گرم وزن خشک)		
طارم هاشمی	۰	-	-	۶۱/۳۳ ± ۱/۸۱ ^A
۲۵	۳۲۵/۷ ± ۱۹/۴ ^B	۳۳/۰۷ ± ۴/۱۰ ^B	۵۲۹/۵۰ ± ۱۶/۴۹ ^B	۴۹/۷۰ ± ۱/۳۵ ^B
۵۰	۴۶۲/۶ ± ۱۵/۳ ^A	۳۹/۰۳ ± ۱/۹۶ ^A	۶۲۰/۵۳ ± ۱۴/۵۷ ^A	۴۰/۵۰ ± ۱/۵۷ ^C
فجر	۰	-	-	۶۲/۷۳ ± ۱/۲۱ ^a
۲۵	۳۴۵/۳ ± ۱۳/۳ ^b	۳۳/۰۰ ± ۱/۷۱ ^b	۴۸۶/۴۳ ± ۱۴/۳۳ ^b	۴۴/۷۷ ± ۱/۳۱ ^b
۵۰	۴۹۳/۳ ± ۱۷/۴ ^a	۴۹/۰۰ ± ۲/۰۳ ^a	۵۶۱/۲۳ ± ۱۲/۹۰ ^a	۳۵/۳۷ ± ۱/۳۶ ^c

- * و ** به ترتیب معنی‌داری در سطح پنج و یک درصد، ns عدم اختلاف معنی‌دار. مقادیر با حروف کوچک یا بزرگ یکسان در هر ستون، فاقد اختلاف معنی‌دار آماری در سطح احتمال ۵ درصد براساس آزمون LSD هستند (n = 4 ± SD).

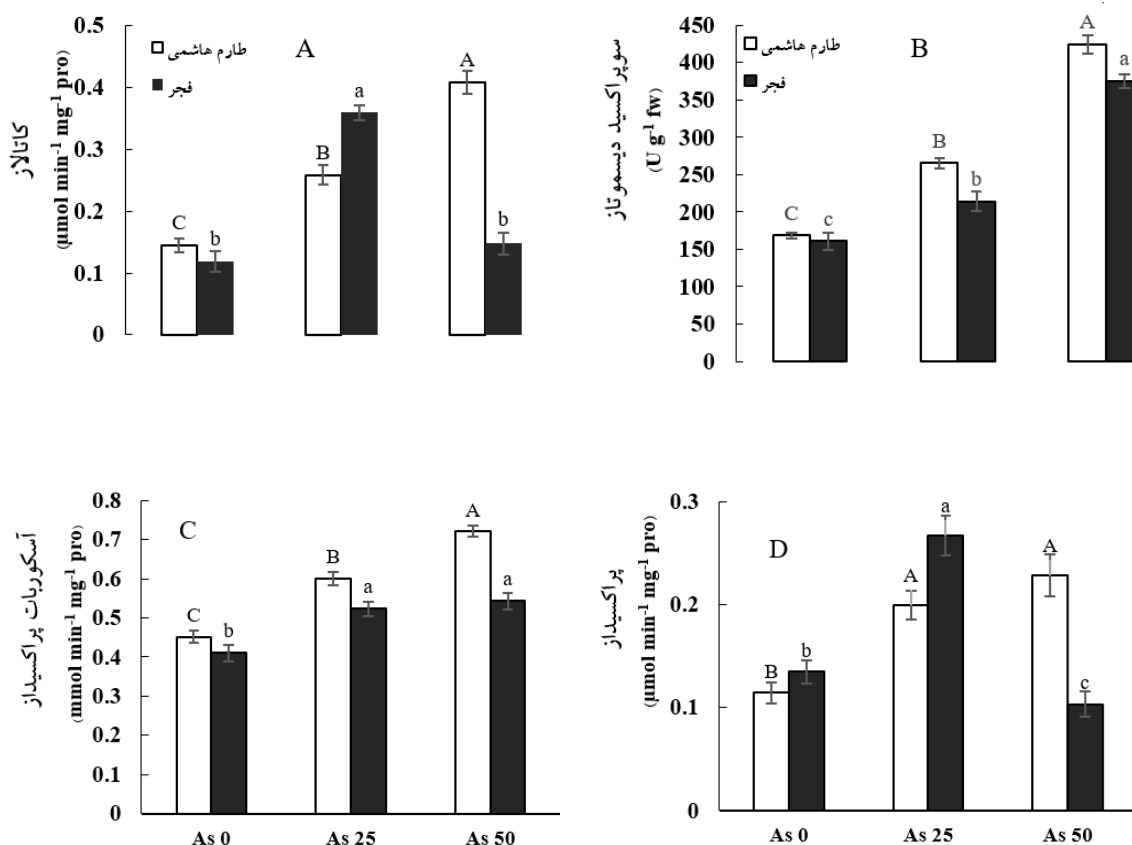
جدول ۴- میانگین مربعات محتوای مالون دی آلدئید، پراکسید هیدروژن و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت برگ دو رقم برنج طارم هاشمی و فجر تحت تنش آرسنیک (صفر، ۲۵ و ۵۰ میکرومولار)

df	مالون دی آلدئید	پراکسید هیدروژن	کاتالاز	سوپراکسید دیسموتاز	آسکوربات پراکسیداز	پراکسیداز
رقم طارم هاشمی						
تیمار	۱۱**	۱۳۷۰**	۰/۰۵**	۵۰۲۳۵**	۰/۰۶**	۰/۰۱**
خطا	۰/۰۳	۴/۳	۰/۰۰۰۲	۷۴	۰/۰۰۰۳	۰/۰۰۰۲
ضریب تغییرات	۳/۶	۲/۴	۵/۶	۳	۲/۸	۸/۵
رقم فجر						
تیمار	۱۲/۶**	۲۳۶۵**	۰/۰۵**	۳۷۵۷۹**	۰/۰۲**	۰/۰۲**
خطا	۰/۰۵	۵/۸	۰/۰۰۰۳	۱۲۵	۰/۰۰۰۴	۰/۰۰۰۲
ضریب تغییرات (درصد)	۴/۱	۲/۷	۷/۵	۴/۵	۴/۱	۸/۹

* و ** به ترتیب معنی‌داری در سطح پنج و یک درصد، ns عدم اختلاف معنی‌دار.



شکل ۱- تاثیر تنش آرسنیک (As، صفر، ۲۵ و ۵۰ میکرومولار) بر پراکسید هیدروژن (A) و مالون دی آلدئید (B) دو رقم برنج طارم هاشمی و فجر. در هر رقم، میانگین‌های دارای حروف مشترک براساس آزمون LSD در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند ($n = 4 \pm$ SD).



شکل ۲- تاثیر غلظت‌های مختلف آرسنیک (As، ۰، ۲۵ و ۵۰ میکرومولار) بر فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (A)، سوپراکسید دیسموتاز (B)، آسکوربات پراکسیداز (C) و پراکسیداز (D) برگ دو رقم برنج طارم هاشمی و فجر. در هر رقم، میانگین‌های دارای حروف مشترک براساس آزمون LSD در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند ($n = 4 \pm$ SD).

احیا شده و اکسید شده و نسبت های آسکوربیک اسید احیا شده به اکسید شده و گلوکاتایون احیا شده بر اکسید شده در

چرخه آسکوربیک اسید-گلوکاتایون: در هر دو رقم برنج، اثر تیمار بر آسکوربیک اسید احیا شده و اکسید شده، گلوکاتایون

جدول ۵- میانگین مربعات چرخه آسکوربیک اسید-گلوتاتیون دو رقم برنج تحت تنش آرسنیک (صفر، ۲۵ و ۵۰ میکرومولار)

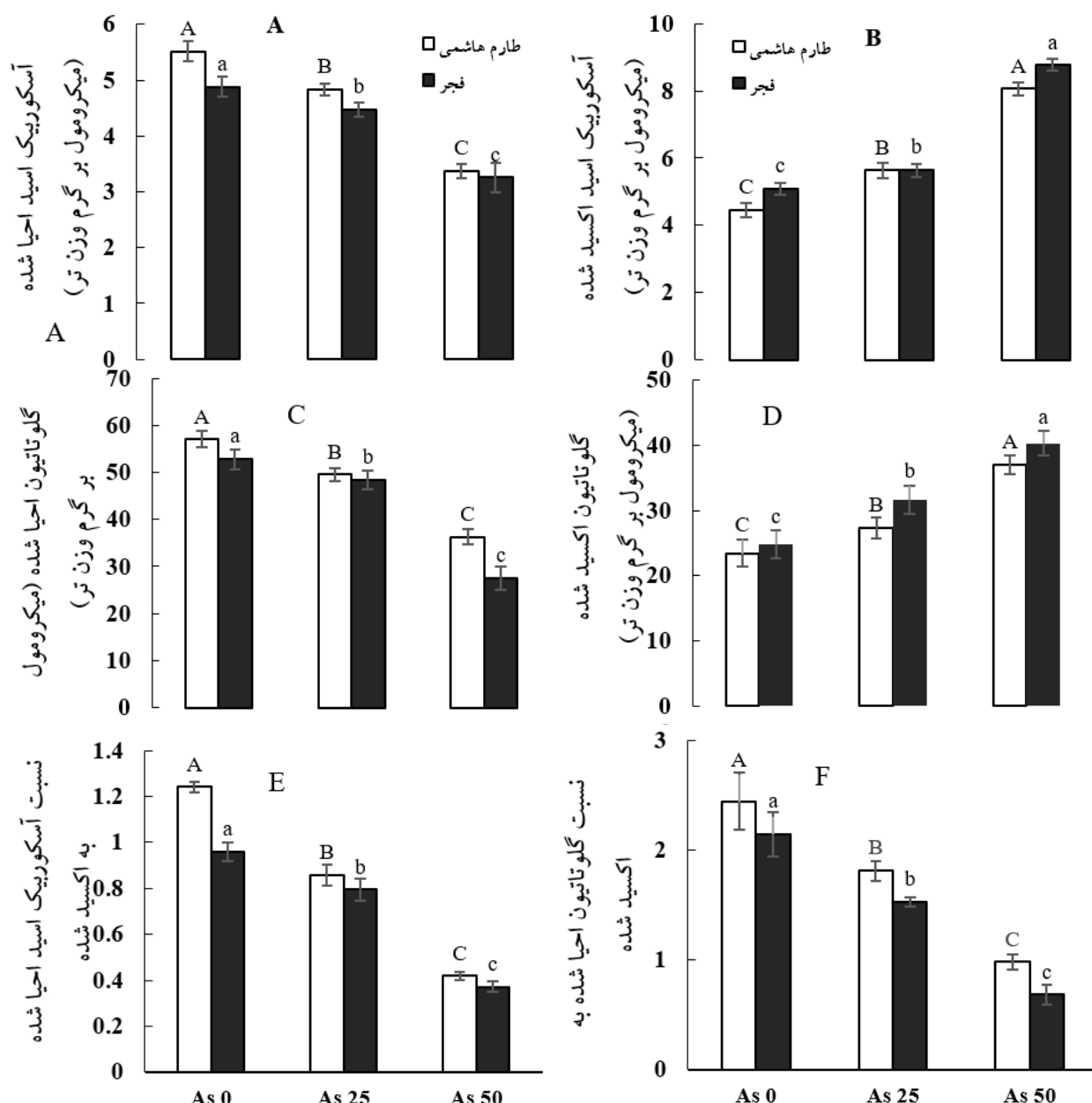
df	آسکوربیک اسید احیا شده	آسکوربیک اسید اکسید شده	گلوتاتیون احیا شده	گلوتاتیون اکسید شده	نسبت آسکوربیک اسید احیا شده به اکسید شده	نسبت گلوتاتیون احیا شده به اکسید شده
رقم طارم هاشمی						
۲ تیمار	۳/۶**	۱۰**	۳۲۹**	۱۴۸**	۰/۵**	۱/۶**
۶ خطا	۰/۰۲	۰/۰۵	۲/۴	۳/۰۳	۰/۰۰۱	۰/۰۳
ضریب تغییرات	۳/۲	۳/۵	۳/۳	۶	۳/۷	۹/۳
رقم فجر						
۲ تیمار	۲/۲**	۱۲**	۵۴۶**	۱۸۳**	۰/۲۸**	۱/۶**
۶ خطا	۰/۰۴	۰/۰۴	۵	۴/۳	۰/۰۰۲	۰/۰۲
ضریب تغییرات (درصد)	۴/۸	۲/۸	۵/۲	۶/۴	۵/۵	۹/۱

* و ** به ترتیب معنی‌داری در سطح پنج و یک درصد، ns عدم اختلاف معنی‌دار.

سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۵). روند کاهش در محتوای آسکوربیک اسید در برگ هر دو رقم برنج مشاهده شد که کمترین محتوای آسکوربیک اسید احیا شده تحت تیمار ۵۰ میکرومولار آرسنیک مشاهده شد. در گیاهان شاهد و گیاهان تیمار شده با ۲۵ میکرومولار، برگ طارم هاشمی دارای محتوای آسکوربیک اسید احیا شده بیشتری نسبت به رقم فجر بود اما تحت تیمار ۵۰ میکرومولار آرسنیک تفاوتی بین دو رقم مشاهده نشد (شکل A۳). برخلاف آسکوربیک اسید احیا شده، محتوای آسکوربیک اسید اکسید شده با اعمال تنش آرسنیک در هر دو رقم برنج افزایش معنی‌داری نشان داد و بیشترین افزایش تحت تیمار ۵۰ میکرومولار آرسنیک مشاهده شد (شکل B۳). محتوای گلوتاتیون احیا شده با اعمال تنش آرسنیک در هر برگ هر دو رقم برنج کاهش معنی‌داری نسبت به گیاهان بدون تنش آرسنیک نشان داد و بیشترین کاهش تحت تیمار آرسنیک ۵۰ میکرومولار در رقم‌های طارم هاشمی و فجر به ترتیب به میزان ۳۶/۳ و ۴۷/۹ درصد ثبت گردید. در تمام سطوح آرسنیک، محتوای گلوتاتیون احیا شده در رقم طارم هاشمی بیشتر از رقم فجر بود (شکل C۳). تیمارهای ۲۵ و ۵۰ میکرومولار آرسنیک باعث افزایش معنی‌داری گلوتاتیون اکسید شده در برگ هر دو رقم طارم هاشمی و فجر شد با

اینحال، در هر دو سطح آرسنیک، محتوای گلوتاتیون اکسید شده در رقم فجر بیشتر از رقم طارم هاشمی بود (شکل D۳). تنش آرسنیک باعث کاهش معنی‌داری در نسبت آسکوربیک اسید احیا شده به اکسید شده در برگ هر دو رقم برنج نسبت به شاهد شد و تحت تیمار ۵۰ میکرومولار آرسنیک به کمترین میزان خود در هر دو رقم برنج رسید. با اینحال، در گیاهان شاهد و گیاهان تیمار شده با ۲۵ میکرومولار آرسنیک، نسبت آسکوربیک اسید احیا شده به اکسید شده در رقم طارم هاشمی بیشتر از رقم فجر بود (شکل E۳). روند کاهش در نسبت گلوتاتیون احیا شده به اکسید شده در برگ هر دو رقم برنج با افزایش غلظت آرسنیک مشاهده شد با اینحال، در تمام سطوح آرسنیک، رقم طارم هاشمی دارای نسبت گلوتاتیون احیا شده به اکسید شده بیشتری نسبت به رقم فجر بود (شکل F۳).

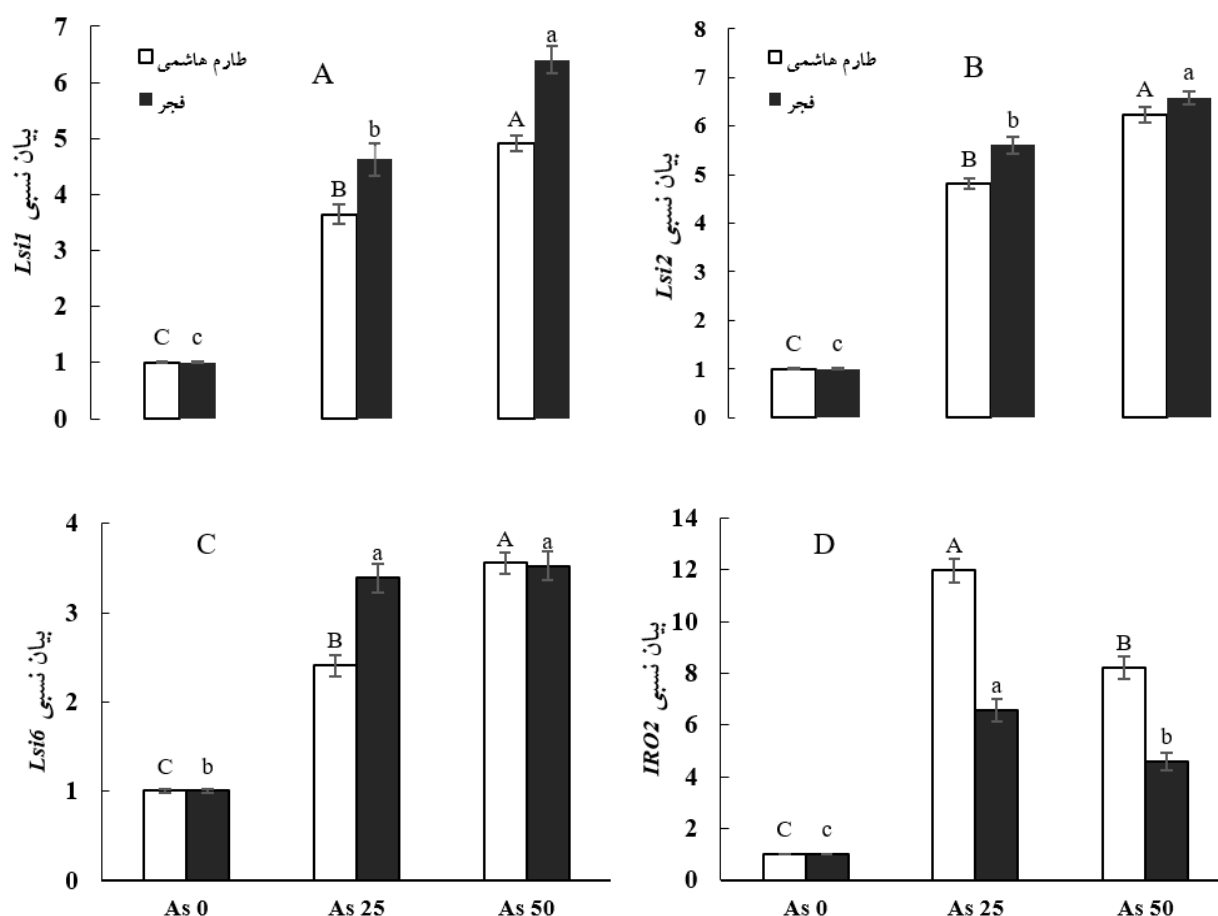
بیان ناقلین‌های آرسنیک و آهن: بررسی سطح بیان ژن‌ها نشان داد که تنش آرسنیک به طور معنی‌داری باعث افزایش سطح بیان دو ژن *Lsi1* و *Lsi2* در ریشه هر دو رقم برنج نسبت به شرایط بدون تنش آرسنیک شد. در هر دو رقم برنج، بالاترین سطح افزایش در بیان ژن‌های *Lsi1* و *Lsi2* تحت تیمار ۵۰ میکرومولار آرسنیک مشاهده شد. در سطوح مشابه آرسنیک، سطح بیان ژن‌های *Lsi1* و *Lsi2* در رقم فجر افزایش بیشتری



شکل ۳- تاثیر غلظت های مختلف آرسنیک (As، صفر، ۲۵ و ۵۰ میکرومولار) بر محتوای آسکوربیک اسید احیا شده (A)، آسکوربیک اسید اکسید شده (B)، گلو تاتیون احیا شده (C)، گلو تاتیون اکسید شده (D) و نسبت های آسکوربیک اسید احیا شده به اکسید شده (E) و گلو تاتیون احیا شده به اکسید شده (F) برگ دو رقم برنج طارم هاشمی و فجر. در هر رقم، میانگین های دارای حروف مشترک براساس آزمون LSD در سطح ۵ درصد تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند ($n = 4 \pm SD$).

تحت تیمار ۵۰ میکرومولار آرسنیک تفاوت معنی داری بین دو رقم برنج مشاهده نشد (شکل C۴). اعمال تنش ۲۵ میکرومولار آرسنیک باعث افزایش معنی داری در سطح بیان ژن *IRO2* در ریشه هر دو رقم برنج نسبت به شاهد شد، با این حال، افزایش بیشتر غلظت آرسنیک باعث

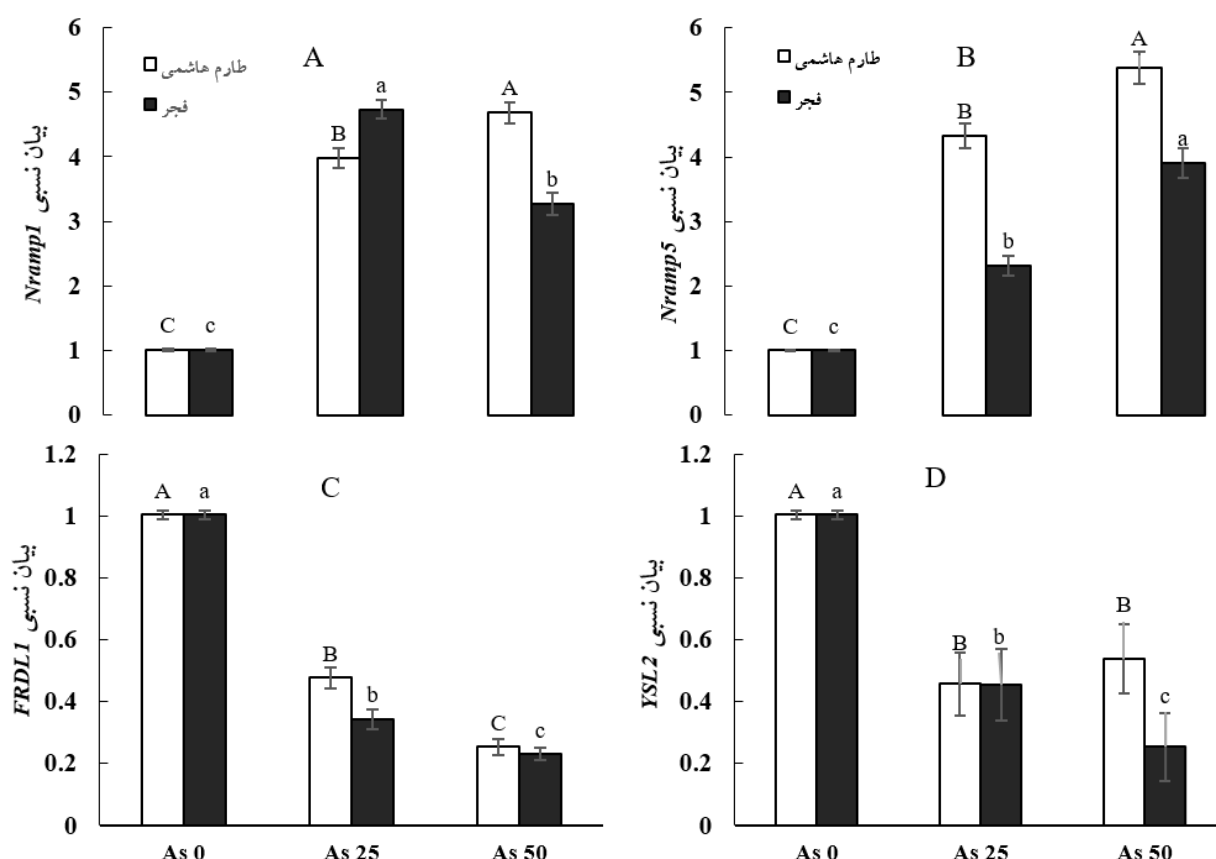
نسبت به رقم طارم هاشمی داشت (شکل A۴، B). بیان ژن *Lsi6* نیز با افزایش غلظت آرسنیک افزایش معنی داری نشان داد بطوریکه بیشترین افزایش تحت غلظت ۵۰ میکرومولار آرسنیک بدست آمد. تحت تیمار ۲۵ میکرومولار آرسنیک، بیان ژن *Lsi6* در رقم فجر به مراتب بیشتر از رقم طارم هاشمی بود با اینحال،



شکل ۴- تاثیر غلظت‌های مختلف آرسنیک (As، صفر، ۲۵ و ۵۰ میکرومولار) بر سطح بیان ژن‌های *Lsi1* (A)، *Lsi2* (B)، *Lsi6* (C) و *IRO2* (D) ریشه دو رقم برنج طارم هاشمی و فجر. در هر رقم، میانگین‌های دارای حروف مشترک براساس آزمون LSD در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند ($n = 4 \pm SD$).

Nramp1 نسبت به رقم طارم هاشمی نشان داد با این حال، تحت تیمار ۵۰ میکرومولار آرسنیک، در رقم هاشمی افزایش بیشتری در بیان ژن *Nramp1* نسبت به رقم فجر مشاهده شد (شکل ۵A). روند افزایشی در سطح بیان ژن *Nramp5* با افزایش غلظت آرسنیک در ریشه هر دو رقم برنج مشاهده شد با اینحال، در تیمارهای مشابه آرسنیک، رقم طارم هاشمی دارای سطح بالاتری از بیان ژن *Nramp5* نسبت به رقم فجر بود (شکل ۵B). تیمارهای آرسنیک باعث کاهش سطح بیان ژن‌های *FRDL1* و *YSL2* در ریشه هر دو رقم برنج نسبت به گیاهان شاهد شد، بطوریکه تحت تیمار ۵۰ میکرومولار، کمترین بیان ژن‌های *FRDL1* و *YSL2* در هر دو رقم ثبت گردید (شکل ۵C، D).

کاهش بیان ژن *IRO2* نسبت به تیمار ۵۰ میکرومولار آرسنیک شد. در تمام سطوح آرسنیک، سطح بیان ژن *IRO2* در رقم طارم هاشمی به طور معنی‌داری بیشتر از رقم فجر بود (شکل ۴D). در رقم طارم هاشمی، افزایش غلظت آرسنیک باعث افزایش سطح بیان ژن *Nramp1* نسبت به گیاهان شاهد شد و به بالاترین سطح بیان خود تحت تیمار ۵۰ میکرومولار آرسنیک به میزان ۴/۷ برابر افزایش نسبت به گیاه شاهد رسید. تیمار ۲۵ میکرومولار آرسنیک باعث افزایش بیان ژن *Nramp1* در ریشه گیاه فجر نسبت به گیاهان شاهد شد با اینحال، افزایش بیشتر آرسنیک به ۵۰ میکرومولار باعث کاهش بیان ژن *Nramp1* نسبت به تیمار ۲۵ میکرومولار شد. همچنین تحت تیمار ۲۵ میکرومولار آرسنیک، رقم فجر افزایش بیشتری در بیان ژن



شکل ۵- تاثیر غلظت‌های مختلف آرسنیک (As، صفر، ۲۵ و ۵۰ میکرومولار) بر سطح بیان ژن‌های (A) *Nrap1*، (B) *Nrap5*، (C) *FRDL1* و (D) *YSL2* ریشه دو رقم برنج طارم هاشمی و فجر. در هر رقم، میانگین‌های دارای حروف مشترک براساس آزمون LSD در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند ($n = 4 \pm SD$).

بحث

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تنش آرسنیک (به خصوص غلظت ۵۰ میکرومولار) تاثیر منفی بر رشد و زیست توده هر دو رقم برنج داشت. نتایج مشابهی از سمیت آرسنیک بر رشد گیاه برنج (Ghorbani et al., 2020) و یونجه (Li et al., 2018) نیز گزارش شده است. در تحقیقی، Ahmad و Gupta (۲۰۱۴) بیان داشتند که اثرات منفی آرسنیک بر گیاهان می‌تواند ناشی از کاهش جذب و انتقال فسفر به اندام هوایی ناشی از سمیت آرسنیک باشد. در گزارش دیگری، Ghorbani و همکاران (۲۰۲۰) نشان دادند که تنش آرسنیک با القای تنش اکسیداتیو و کاهش رنگیزه‌های فتوسنتزی و همچنین کاهش انتقال آهن به اندام هوایی باعث کاهش رشد گیاه برنج شد. نتایج همچنین نشان داد که اثرات سمیت آرسنیک بر رشد دو

رقم طارم هاشمی و فجر متفاوت بود که بیان می‌کند تحمل گیاه برنج به سمیت آرسنیک تا حد زیادی تحت تاثیر وارته گیاهی می‌باشد. محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی نشان دهنده میزان آسیب وارده به دستگاه فتوسنتزی تحت شرایط تنش‌زا می‌باشد (Ghorbani et al., 2019b; Ghasemi-Omran et al., 2021). نتایج نشان داد که تیمارهای آرسنیک باعث کاهش محتوای کلروفیل a و b و افزایش کاروتنوئیدها و در نتیجه، کاهش عملکرد فلورسانس کلروفیل در هر دو رقم برنج شد که مطابق نتایج Ghorbani و همکاران (۲۰۲۰) در گیاه برنج می‌باشد. کاهش در محتوای کلروفیل‌ها توسط آرسنیک می‌تواند ناشی از افزایش فعالیت کلروفیل‌از و یا ممانعت سنتز پیش‌ماده های سنتز کلروفیل‌ها مانند گاما-آمینولولینیک اسید دهیدروژناز و گاما آمینولولینیک اسید توسط آرسنیک باشد

(Patel et al., 2018). همچنین پیشنهاد شده است که کاهش محتوای کلروفیل تحت سمیت فلزات سنگین می‌تواند ناشی از افزایش تجمع پراکسید هیدروژن و پراکسیداسیون غشاهای کلروپلاست و در نتیجه، آسیب به دستگاه فتوسنتزی باشد (Piotrowska-Niczyporuk et al., 2012; Gerami et al., 2018). گزارش شده است که افزایش تجمع کاروتنوئیدها در سلول‌های اپیدرمی می‌تواند از کلروپلاست‌ها محافظت کند (Czerpak et al., 2006; Ghorbani et al., 2018a)، بنابراین افزایش تجمع کاروتنوئیدها تحت سمیت آرسنیک می‌تواند نشان دهنده القای پاسخ دفاعی گیاه برای بهبود تحمل گیاه باشد.

جذب و تجمع آرسنیک در ریشه و برگ هر دو رقم برنج با افزایش غلظت آرسنیک افزایش یافت با اینحال، تجمع آرسنیک در رقم فجر بیشتر از رقم طارم هاشمی بود. بنابراین افزایش بیشتر آرسنیک در رقم فجر می‌تواند دلیل اصلی کاهش بیشتر در رشد و تولید زیست توده این رقم تحت سمیت آرسنیک نسبت به رقم طارم هاشمی باشد. در تحقیقی، Britto و همکاران (۲۰۱۱) تحمل به آرسنیک ۱۰ رقم مختلف برنج به سمیت آرسنیک را مورد بررسی قرار دادند و بیان کردند که تجمع آرسنیک در ارقام حساس بیشتر از ارقام متحمل بود. در گزارش دیگری، Majumder و همکاران (۲۰۱۹) تاثیر تنش آرسنیک بر هشت رقم برنج مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که همبستگی منفی بین میزان تجمع آرسنیک و تحمل گیاه به سمیت آرسنیک وجود دارد. نتایج همچنین نشان داد که انتقال آرسنیک به برگ‌ها در رقم طارم هاشمی کمتر از رقم فجر بود که نشان می‌دهد طارم هاشمی با کاهش انتقال آرسنیک به بخش‌هایی، از اندام‌های فتوسنتز کننده در مقابل سمیت آرسنیک محافظت می‌کند. گزارش شده است که تجمع آرسنیک در برگ‌ها با کاهش بیوستز کلروفیل و آسیب به غشاهای کلروپلاست، باعث کاهش نسبت فتوسنتز در گیاه می‌شود (Ghorbani et al., 2020)، بنابراین انتقال کمتر آرسنیک به اندام هوایی در رقم طارم هاشمی نقش مهمی در محافظت رنگیزه‌های فتوسنتزی و دستگاه فتوسنتزی در مقابل سمیت

آرسنیک خواهد داشت. نتایج همچنین نشان داد که تنش آرسنیک باعث افزایش تجمع آهن در ریشه و کاهش تجمع آهن در برگ هر دو رقم برنج شد که مطابق نتایج Ghorbani و همکاران (۲۰۲۰) و Singh و همکاران (۲۰۱۵) می‌باشد. Ghorbani و همکاران (۲۰۲۰) نشان دادند که آرسنیک با تاثیر منفی بر بیان ناقلین انتقال آهن به اندام هوایی، باعث کاهش تجمع آهن در برگ‌های برنج شد. با توجه به نقش آهن در سنتز کلروفیل، یکی از دلایل کاهش محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی کمبود آهن القاشده توسط سمیت آرسنیک در برگ‌ها می‌باشد. با اینحال، تجمع آهن در برگ رقم طارم هاشمی بیشتر از رقم فجر بود که می‌تواند در افزایش سنتز کلروفیل و در نتیجه بهبود رشد رقم طارم هاشمی نقش موثری داشته باشد.

نتایج نشان داد که تنش آرسنیک باعث افزایش محتوای پراکسید هیدروژن و سطح مالون دی آلدئید در هر دو رقم برنج شد که نشان دهنده القای تنش اکسیداتیو می‌باشد. نتایج بدست آمده مشابه نتایج Ghorbani و همکاران (۲۰۲۱) و Majumder و همکاران (۲۰۱۹) می‌باشد. سطح بالاتر پراکسید هیدروژن و مالون دی آلدئید در رقم فجر نشان دهنده تنش اکسیداتیو شدیدتر در این رقم برنج نسبت به رقم طارم هاشمی می‌باشد. نتایج مشابهی از تغییرات وابسته به رقم در سطح تنش اکسیداتیو القا شده در گیاه برنج تحت سمیت فلزات سنگین توسط Shahnawaz و همکاران (۲۰۱۷) نیز گزارش شده است. در گزارش دیگری، Mallick و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که سطح پراکسید هیدروژن و مالون دی آلدئید در رقم برنج حساس به آرسنیک به مراتب بیشتر از رقم متحمل بود. نتایج این تحقیق نشان داد که فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت در برگ هر دو رقم برنج تحت سمیت آرسنیک افزایش یافت که نشان دهنده مکانیسم دفاعی گیاه برای مقابله با تنش اکسیداتیو القا شده توسط تنش آرسنیک می‌باشد. افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت در رقم طارم هاشمی به طور معنی‌داری بیشتر از رقم فجر بود که نشان‌دهنده سیستم دفاعی کارآمدتر در رقم طارم هاشمی می‌باشد. بنابراین، رقم طارم هاشمی با

افزایش بیشتر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت باعث کاهش بیشتر انواع اکسیژن فعال مانند پراکسید هیدروژن و در نتیجه، محافظت از لیپیدهای غشایی و کاهش سطح مالون دی آلدئید شد که نقش مهمی در تحمل سمیت آرسنیک دارد. کاهش سطح فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در رقم فجر تحت تنش ۵۰ میکرومولار آرسنیک نشان دهنده عدم کارایی این دو آنزیم در رقم فجر در خنثی‌سازی انواع رادیکال‌های آزاد و بهبود تحمل گیاه تحت سمیت آرسنیک می‌باشد.

گلوکاتایون و آسکوربیک اسید ترکیبات ردوکس مهمی هستند که نقش مهمی در کاهش تنش اکسیداتیو در گیاهان دارند (Ghorbani et al. 2018b). نتایج تحقیق حاضر نشان داد تنش آرسنیک باعث کاهش محتوای آسکوربیک اسید و گلوکاتایون احیا شده و در نتیجه، کاهش نسبت آسکوربیک اسید احیا شده به اکسید شده و نسبت گلوکاتایون احیا شده به اکسید شده در برگ هر دو رقم برنج شد که نشان دهنده القای تنش اکسیداتیو تحت سمیت آرسنیک می‌باشد. نتایج مشابهی از سمیت آرسنیک بر شرایط ردوکس چرخه آسکوربیک اسید-گلوکاتایون در گیاه برنج توسط Ghorbani و همکاران (۲۰۲۰) قبل از گزارش شده است. Singh و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که بهبود حالت ردوکس چرخه آسکوربیک اسید-گلوکاتایون باعث بهبود تحمل گیاه تحت سمیت آرسنیک می‌شود که نشان دهنده اهمیت آن در کاهش سمیت آرسنیک می‌باشد.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تنش آرسنیک باعث افزایش سطح بیان هر دو ژن *Lsi1* و *Lsi2* در ریشه هر دو رقم برنج شد که با افزایش جذب آرسنیک در ریشه هر دو رقم برنج مطابقت دارد. افزایش سطح بیان ژن‌های *Lsi1* و *Lsi6* تحت سمیت آرسنیک در گیاه برنج که با افزایش تجمع آرسنیک در ریشه همراه بود توسط Singh و همکاران (۲۰۱۵) و Ghorbani و همکاران (۲۰۲۰) نیز گزارش شده است. بنابراین افزایش تجمع آرسنیک در هر دو رقم برنج تحت تنش آرسنیک می‌تواند ناشی از افزایش سطح رونویسی ناقلین‌های *Lsi1* و *Lsi6* باشد. نتایج همچنین نشان داد میزان افزایش در سطح بیان ژن‌های *Lsi1* و *Lsi6* در رقم فجر بیشتر از رقم طارم

هاشمی تحت تنش آرسنیک بود که با تجمع بیشتر آرسنیک در رقم فجر مطابقت دارد. ناقلین *Lsi2* در انتقال آرسنیت از ریشه به اندام هوایی در گیاه برنج نقش دارد. نتایج نشان دادند که تنش آرسنیک به طور معنی‌داری باعث افزایش سطح رونویسی *Lsi2* در ریشه هر دو رقم برنج شد که با افزایش تجمع آرسنیک در برگ‌ها مطابقت دارد. افزایش سطح بیان ژن *Lsi2* و در نتیجه، افزایش تجمع آرسنیک در اندام هوایی گیاه برنج توسط Singh و همکاران (۲۰۱۵) نیز گزارش شده است. بنابراین، تجمع بیشتر آرسنیک در برگ‌های رقم فجر می‌تواند ناشی از سطح بالاتر بیان ژن *Lsi2* در این رقم نسبت به رقم طارم هاشمی باشد.

نتایج نشان داد تیمارهای آرسنیک باعث افزایش سطح رونویسی هر دو ژن *Nramp1* و *Nramp5* در ریشه هر دو رقم برنج شد. افزایش بیان ژن‌های *Nramp1* و *Nramp5* در ریشه گیاه برنج تحت تنش آرسنیک و نقش آنها در جذب آهن و آرسنیک قبلاً نیز گزارش شده است (Ghorbani et al., 2020). ناقلین‌های *FRDL1* و *YSL2* در انتقال آهن به آوندهای چوبی و در نتیجه انتقال آن به اندام هوایی و بذرها در گیاه برنج نقش دارند (Ishimaru et al., 2012). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که سمیت آرسنیک باعث کاهش سطح بیان هر دو ژن *FRDL1* و *YSL2* در ریشه هر دو رقم برنج شد که با کاهش انتقال آهن به اندام هوایی و در نتیجه تجمع آهن ریشه مطابقت دارد. نتایج مشابهی نیز از کاهش رونویسی ژن‌های *FRDL1* و *YSL2* در گیاه برنج تحت سمیت آرسنیک قبلاً گزارش شده است (Singh et al., 2015). در گزارشی Ishimaru و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که کاهش سطح بیان ژن *YSL2* باعث کاهش انتقال آهن به اندام هوایی و بذر گیاه برنج شد که تایید کننده نقش این ناقلین در انتقال آهن به اندام هوایی است. بنابراین، کاهش تجمع آهن در برگ‌های هر دو رقم طارم هاشمی و فجر می‌تواند تا اندازه‌ای ناشی از اثرات منفی آرسنیک بر سطح بیان ژن‌های *FRDL1* و *YSL2* باشد. تجمع بیشتر آهن در برگ‌های رقم طارم هاشمی نسبت به رقم فجر تحت سمیت آرسنیک می‌تواند ناشی از سطح بالاتر بیان ژن

های *FRDL1* و *YSL2* باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج کلی تحقیق نشان داد که تنش آرسنیک با افزایش پراکسید هیدروژن و القای تنش اکسیداتیو، باعث آسیب به غشاهای زیستی و کاهش رنگیزه‌های فتوسنتزی در هر دو رقم برنج شد که با کاهش رشد و زیست توده گیاه همراه بود. تنش آرسنیک همچنین با افزایش سطح بیان ژن‌های *Lsi1*، *Lsi2* و *Lsi6* باعث افزایش جذب آرسنیک توسط ریشه و انتقال آن به اندام هوایی در هر دو رقم برنج شد. آرسنیک با تاثیر منفی بر سطح بیان ناقلین آهن به اندام هوایی باعث کاهش تجمع آهن در برگ هر دو رقم برنج شد. سطح پایین تر بیان ژن‌های درگیر در جذب

و انتقال آرسنیک و تنظیم افزایشی ناقلین‌های تنظیم کننده انتقال آهن در رقم طارم هاشمی باعث کاهش تجمع آرسنیک و افزایش تجمع آهن در برگ رقم هاشمی نسبت به رقم فجر شدند که می‌تواند نقش مهمی در سازگاری بیشتر این رقم تحت سمیت آرسنیک نسبت به رقم فجر داشته باشد. نتایج کلی نشان دادند که رقم طارم هاشمی نسبت به سمیت آرسنیک تا اندازه‌ای محتمل‌تر از رقم فجر بود که یکی از دلایل می‌تواند به خاطر بومی بودن رقم طارم هاشمی نسبت به رقم اصلاحی فجر باشد، با اینحال، تحقیقات بیشتری برای شناخت تاثیر بومی یا اصلاحی بودن بر میزان تحمل گیاه برنج به سمیت آرسنیک، با دیگر ارقام بومی و اصلاحی برنج در شرایط مزرعه‌ای و گلخانه‌ای موردنیاز است.

منابع

- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S. and Karanov, E. (2001) The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Journal of Plant Cell and Environment* 24: 1337-1344.
- Beauchamp, C. and Fridovich, I. (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 44: 276-287.
- Britto, J. D. R., Sujin, M. R., Sebastian, S. R. and Dharmar, K. (2011) Toxic effect of arsenic on ten rice varieties. *Journal of Agricultural Research* 1: 011-016.
- Czerpak, R., Piotrowska, A. and Szulecka, K. (2006) Jasmonic acid affects changes in the growth and some components content in alga *Chlorella vulgaris*. *Acta Physiologiae Plantarum* 28: 195-203.
- Dutilleul, C., Driscoll, S., Cornic, G., De Paepe, R., Foyer, C. H. and Noctor, G. (2003) Functional mitochondrial complex I is required by tobacco leaves for optimal photosynthetic performance in photorespiratory conditions and during transients. *Plant Physiology* 131: 264-275.
- Gerami, M., Ghorbani, A. and Karimi, S. (2018) Role of salicylic acid pretreatment in alleviating cadmium-induced toxicity in *Salvia officinalis* L. *Iranian Journal of Plant Biology* 10: 81-95.
- Ghasemi-Omran, V. O., Ghorbani, A. and Sajjadi-Otaghsara, S. A. (2021) Melatonin alleviates NaCl-induced damage by regulating ionic homeostasis, antioxidant system, redox homeostasis, and expression of steviol glycosides-related biosynthetic genes in in vitro cultured *Stevia rebaudiana* Bertoni. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 57: 319-331.
- Ghorbani, A., Ghasemi Omran, V. O., Razavi, S. M., Pirdashti, H. and Ranjbar, M. (2019a) *Piriformospora indica* confers salinity tolerance on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) through amelioration of nutrient accumulation, K^+/Na^+ homeostasis and water status. *Plant Cell Reports* 38: 1151-1163.
- Ghorbani, A., Pishkar, L., Roodbari, N., Pehlivan, N. and Wu, C. (2021) Nitric oxide could allay arsenic phytotoxicity in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) by modulating photosynthetic pigments, phytochelatin metabolism, molecular redox status and arsenic sequestration. *Plant Physiology and Biochemistry* 167: 337-348.
- Ghorbani, A., Razavi, S. M., Ghasemi Omran, V. and Pirdashti, H. (2019b) Effects of endophyte fungi symbiosis on some physiological parameters of tomato plants under 10 day long salinity stress. *Journal of Plant Process and Function* 7: 193-208.
- Ghorbani, A., Razavi, S. M., Ghasemi Omran, V. O. and Pirdashti, H. (2018a) *Piriformospora indica* inoculation alleviates the adverse effect of NaCl stress on growth, gas exchange and chlorophyll fluorescence in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Plant Biology* 20: 729-736.
- Ghorbani, A., Razavi, S. M., Ghasemi Omran, V. O. and Pirdashti, H. (2018b) *Piriformospora indica* alleviates salinity by boosting redox poise and antioxidative potential of tomato. *Russian Journal of Plant Physiology* 65: 898-907.
- Ghorbani, A., Tafteh, M., Roudbari, N., Roudbari, N., Pishkar, L., Zhang, W. and Wu, C. (2020) *Piriformospora indica* augments arsenic tolerance in rice (*Oryza sativa*) by immobilizing arsenic in roots and improving iron translocation to shoots. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 209: 111793.

- Ghorbani, A., Zarinkamar, F. and Fallah, A. (2009) The effect of cold stress on the morphologic and physiologic characters of tow rice varieties in seedling stage. *Journal of Crop Breeding* 1: 50–66.
- Ghorbani, A., Zarinkamar, F. and Fallah, A. (2011) Effect of cold stress on the anatomy and morphology of the tolerant and sensitive cultivars of rice during germination. *Journal of Cell & Tissue* 2: 235–244.
- Gill, M. (2014) Heavy metal stress in plants: a review. *International Journal of Advanced Research* 2: 1043–1055.
- Gupta, M. and Ahmad, M. A. (2014) Arsenate induced differential response in rice genotypes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 107: 46–54.
- Heath, R. L. and Packer, L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of biochemistry and biophysics* 125: 189–198.
- Ishimaru, Y., Takahashi, R., Bashir, K., Shimo, H., Senoura, T. and Sugimoto, K. (2012) Characterizing the role of rice NRAMP5 in manganese, iron and cadmium transport. *Scientific Reports* 2: 286.
- Kobayashi, T. and Nishizawa, N. K. (2012) Iron uptake, translocation and regulation in higher plants. *Annual Review of Plant Biology* 63: 131–152.
- Kumar, S., Dubey, R. S., Tripathi, R. D., Chakrabarty, D. and Trivedi, P. K. (2015) Omics and biotechnology of arsenic stress and detoxification in plants: current updates and prospective. *Environment International* 74: 221–230.
- Li, J., Sun, Y., Jiang, X., Chen, B. and Zhang, X. (2018) Arbuscular mycorrhizal fungi alleviate arsenic toxicity to *Medicago sativa* by influencing arsenic speciation and partitioning. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 157: 235–243.
- Lichtenthaler, H. K. (1987) Chlorophyll and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembrane. *Methods in Enzymology* 148: 350–381.
- Ma, J. F., Yamaji, N., Mitani, N., Xu, X. Y., Su, Y. H., McGrath, S. P. and Zhao, F. J. (2008) Transporters of arsenite in rice and their role in arsenic accumulation in rice grain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 9931–9935.
- Majumder, B., Das, S., Mukhopadhyay, S. and Biswas, A. K. (2019) Identification of arsenic-tolerant and arsenic-sensitive rice (*Oryza sativa* L.) cultivars on the basis of arsenic accumulation assisted stress perception, morpho-biochemical responses, and alteration in genomic template stability. *Protoplasma* 256: 193–211.
- Mallick, S., Kumar, N., Sinha, S., Dubey, A. K., Tripathi, R. D. and Srivastav, V. (2014) H₂O₂ pretreated rice seedlings specifically reduces arsenate not arsenite: difference in nutrient uptake and antioxidant defense response in a contrasting pair of rice cultivars. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 20: 435–447.
- Mishra S, Stärk HJ, Küpper HA (2014) A different sequence of events than previously reported leads to arsenic-induced damage in *Ceratophyllum demersum* L. *Metallomics* 6:444–454.
- Patel, A., Tiwari, S., Prasad, S. M. (2018) Toxicity assessment of arsenate and arsenite on growth, chlorophyll a fluorescence and antioxidant machinery in *Nostoc muscorum*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 157: 369–379.
- Petrov, V., Hille, J., Mueller-Roeber, B. and Gechev, T. S. (2015) ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants. *Frontiers in Plant Science* 6: 69.
- Piotrowska-Niczyporuk, A., Bajguz, A., Zambrzycka, E. and Godlewska-Żyłkiewicz, B. (2012) Phytohormones as regulators of heavy metal biosorption and toxicity in green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae). *Plant Physiology and Biochemistry* 52: 52–65.
- Sairam, R. K., Rao, K. V. and Srivastava, G. C. (2002) Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Science* 163: 1037–1046.
- Shahnawaz, M. D., Chouhan, R. and Sanadhya, D. (2017) Impact of aluminum toxicity on physiological aspects of barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars and its alleviation through ascorbic acid and salicylic acid seed priming. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6: 875–891.
- Singh, A. P., Dixit, G., Mishra, S., Dwivedi, S., Tiwari, M., Mallick, S., Pandey, V., Trivedi, P. K., Chakrabarty, D. and Tripathi, R. D. (2015) Salicylic acid modulates arsenic toxicity by reducing its root to shoot translocation in rice (*Oryza sativa* L.). *Frontiers in Plant Science* 6: 340.

An evaluation of physiological and molecular responses of two rice cultivars to arsenic toxicity

Seyed Reza Mousavi¹, Yosoof Niknejad^{1*}, Hormoz Fallah¹, Davood Barari Tari¹

1 Department of Agronomy, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran

(Received: 22/02/2021; Accepted: 31/05/2021)

Abstract

Arsenic (As) toxicity can be a hazardous threat to sustainable agriculture as well as human health. In order to investigate the effect of As (0, 25 and 50 μ M) on growth, physiological traits and expression of As and Fe transporters in Tarom Hashemi and Fajr rice cultivars, a factorial experiment based on a completely randomized design was conducted in 2020 in greenhouse conditions at Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran. As treatments included 0, 25 and 50 μ M. The results showed that As stress enhanced the uptake and accumulation of As in the roots and leaves of both rice cultivars by increasing the expression of *Lsi1*, *Lsi2* and *Lsi6* genes. As toxicity downregulated the expression of genes involved in Fe translocation to the shoot, declined the Fe accumulation in the leaves and, consequently, reduced chlorophyll content in both rice cultivars. As stress induced oxidative stress by inducing the accumulation of hydrogen peroxide and reducing the ascorbic acid and glutathione content, resulting in low growth in both rice cultivars. However, higher activity of antioxidant enzymes in T. Hashemi reduced the level of hydrogen peroxide and malondialdehyde compared to Fajr. Higher expression of *Lsi1*, *Lsi2*, *Lsi6*, *YSL2* and *FRDL1* genes in T. hashemi caused lower As uptake and higher Fe accumulation in leaves than Fajr, which can play an important role in improving T. hashemi growth under As toxicity. Our findings showed that T. hashemi showed more tolerance to As phytotoxicity than Fajr cultivar with a more effective defense system and regulation of the expression of genes involved in the uptake and translocation of As and Fe.

Keywords: Arsenic, *Oryza sativa* L., Tarom hashemi, Fajr, Arsenic transporter, Oxidative stress

Corresponding author, Email: yousofniknejad@gmail.com