مقاله پژوهشی

بررسی اثر آرسنیک و سدیم نیتروپروساید بر پاسخ‌های فیزیولوژیک و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گیاه *Isatis cappadocica*

زهرا سوری و ناصر کریمی*

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی کرمانشاه

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۱/۰۷، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۸/۰۵/۱۱)

چکیده

تنش آرسنیک از طریق ایجاد تنش اکسیداتیو، سبب بروز علائم سمیتی (کاهش رشد و محتوی کلروفیل) در گیاهان می‌گردد. نیتریک اکساید (NO) به واسطه القای سیستم آنتی‌اکسیدانی، نقش مؤثری را در کاهش تنش اکسیداتیو بر عهده دارد. در این تحقیق نقش سدیم نیتروپروساید (SNP) به‌عنوان آزادکننده NO، بر پاسخ‌های گیاه *I. cappadocica* در سطوح بالای آرسنیک مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تنش آرسنیک باعث ایجاد تنش اکسیداتیو و در نتیجه کاهش رشد می‌شود، درحالی‌که SNP باعث کاهش این اثرات مهاری می‌گردد. بیشترین میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در تیمار ۱۰۰۰ میکرومولار آرسنیک و در حضور SNP مشاهده گردید. این نتایج نشان می‌دهد که کاربرد SNP به‌عنوان فعال‌کننده آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان توانسته نقش جبرانی در برابر تنش آرسنیک ایفا کند و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه را در برابر شرایط تنش افزایش دهد. از سوی دیگر در تیمار ۱۵۰۰ میکرومولار میزان فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POD)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، گلوتاتیون ردوکتاز (GR) با کاهش مواجه شدند، که این کاهش می‌تواند بیانگر این مطلب باشد که در تیمار ۱۵۰۰ میکرومولار، مقابله با تنش اکسیداتیو خارج از توان گیاه بوده و مکانیسم‌های دفاع آنزیمی گیاه در مقابل تنش اکسیداتیو مؤثر نبوده است. برخلاف سایر آنزیم‌ها، فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس ترانسفراز (GST) در غلظت‌های بالای آرسنیک، نه تنها با کاهش مواجه نشد، بلکه افزایش نیز یافت. این مسأله بیانگر این مطلب است که احتمالاً فعالیت آنزیم GST از اهمیت بالایی در کاهش سمیت سطوح بالای آرسنیک برخوردار است.

کلمات کلیدی: تنش اکسیداتیو، سمیت‌زدایی، نیتریک اکساید، *I. cappadocica*

مقدمه

در سال‌های اخیر، با توجه به شتاب روز افزون روند صنعتی شدن جوامع، کشاورزی فشرده (استفاده بی‌رویه از کودها) و گسترش فعالیت‌های معدن کاوی، افزایش آلودگی‌ها و اختلال در محیط زیست در اثر فعالیت‌های بشری، به‌طور فزاینده‌ای در حال گسترش است (Emamverdian *et al*., 2015; Sarwar *et al*., 2017). از پیامدهای این اختلال می‌توان به تجمع فلزات سنگین اشاره کرد، که اکوسیستم طبیعی و سلامت عمومی همه موجودات زنده را به مخاطره انداخته است (Emamverdian *et al*., 2015). از این‌رو آلودگی فلزات سنگین همواره به‌عنوان یکی از جدی‌ترین مشکلات زیست محیطی مطرح می‌گردد و این مسأله باعث تمرکز تحقیقات عمده‌ای در این زمینه شده

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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.41.3.3]

است (Tripathi *et al*., 2007; Karimi *et al*., 2010; Emamverdian *et al*., 2015; Souri *et al*., 2017). اگرچه آلودگی به فلزات سنگین بیشتر متعلق به کشورهای جنوب شرقی آسیا است، ولی در مناطقی از ایران نیز آلودگی خاک و آب به این آلاینده‌ها از جمله آرسنیک گزارش شده است (Mosaferi *et al*., 2004; Karimi *et al*., 2010).

آرسنیک (As) یکی از سموم مهم محیطی است که توانایی تجمع در گیاهان و جانوران را داشته و به وسیله زنجیره غذایی به انسان منتقل می‌گردد (Roy and Saha, 2002; Rodriguez-Ruiz *et al*., 2018). این شبه فلز به‌طور عمده در سیستم ریشه‌ای و به میزان کمتری در اندام‌های هوایی تجمع پیدا کرده و باعث ایجاد تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در گیاهان می‌گردد (Souri *et al*., 2017). برخی از گیاهان به دلیل داشتن سیستم دفاعی بسیار کارآمد، قادر به رشد در مناطق آلوده هستند و می‌توانند بدون بروز علائم سمیت، مقادیر بالایی از عناصر سمی را در اندام‌های هوایی خود تجمع دهند (Meagher, 2000; Tripathi *et al*., 2007; Rascio and Navari-Izzo, 2011). از این دسته از گیاهان در تکنیک گیاه پالایی استفاده می‌کنند که تکنیکی نتیجه‌بخش ارزان و حافظ محیط زیست جهت رفع آلودگی‌های محیطی از فلزات سنگین است (Meagher, 2000). به این گروه از گیاهان مقاوم که تعداد آنها بسیار معدود هستند و از نظر فیزیولوژیکی، گیاهان منحصر به فردی محسوب می‌شوند، گیاهان بیش انباشتگر می‌گویند (Meagher, 2000, Tripathi *et al*., 2007; Karimi *et al*., 2009; Rascio and Navari-Izzo, 2011). در سال ۲۰۰۹ کریمی و همکاران، گیاه *I. cappadocica* را به‌عنوان اولین گیاه نهاندانه بیش انباشتگر آرسنیک معرفی کردند و در مطالعاتی که در ادامه صورت گرفته است مشخص شده که این گیاه نسبت به تنش آرسنیک از مقاومت بالایی برخوردار است (Karimi *et al*., 2009; Karimi *et al*., 2010; Karimi and Souri, 2013; Karimi and Souri, 2015; Karimi and Souri, 2016; Souri *et al*., 2017; Souri *et al*., 2018).

یکی از اثرات سمیتی آرسنیک در گیاهان، افزایش میزان گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) است (Hartley-Whitaker *et al*., 2001)، که منجر به بروز خسارات بسیاری از جمله پراکسیداسیون لیپیدها، اکسیداسیون پروتئین‌ها، تخریب کلروپلاست‌ها و کاهش رنگیزه‌ها می‌گردد (Singh *et al*., 2006; Tripathi *et al*., 2012; Souri *et al*., 2018). افزایش مقاومت به تنش فلزات سنگین، به افزایش سیستم دفاعی اکسیداتیو که شامل آنزیم‌ها و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی است، وابسته است و گیاهانی که دارای سطوح بالای آنتی‌اکسیدان دائمی یا القایی هستند، در برابر خسارات ناشی از تنش اکسیداتیو مقاوم‌تر هستند (Shahid *et al*., 2014; Souri *et al*., 2018). در گیاهان مقاوم به آرسنیک، کاهش تنش اکسیداتیو به علت افزایش فعالیت آنزیم‌های مختلفی نظیر سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POD)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و گلوتاتیون ردوکتاز (GR) بوده و در مطالعات قبلی مشخص شده است که افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان یکی از استراتژی‌های مهم گیاه *I. cappadocica*، جهت مقاومت به غلظت‌های بالای آرسنیک و کاهش آسیب‌های ناشی از تنش اکسیداتیو است (Karimi and Souri, 2016; Souri *et al*., 2018).

نیتریک اکساید (NO) به‌عنوان یک مولکول سیگنالینگ در بسیاری از بافت‌های گیاهی، نقش تنظیم‌کننده را بر عهده دارد و در طیف گسترده‌ای از پروسه‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی و همچنین پاسخ‌های گیاه به انواع تنش‌ها، شرکت می‌کند (Siddiqui *et al*., 2011; Sandalio *et al*., 2012; Maurya and Rani, 2017). در شرایط تنش اکسیداتیو، NO می‌تواند از طریق کاهش تولید ROS، به عنوان یک آنتی‌اکسیدان عمل کند (Maurya and Rani, 2017) و باعث تعدیل ROS و تخریب‌های ناشی از آن گردد (Gill *et al*., 2013; Liu *et al*., 2018). به‌کاربردن ترکیب سدیم نیتروپروساید (SNP) به عنوان آزادکننده NO، باعث افزایش توانایی گیاهان در برابر تنش فلزات سنگین می‌گردد (Neill *et al*., 2003; Liu *et al*., 2018). آزمایشات مختلف نشان داده‌اند که استفاده از SNP، می‌تواند باعث محافظت گیاه در برابر تنش اکسیداتیو شود و همچنین موجب افزایش رشد در گونه‌های مختلف گیاهی در

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.41.3.3]

معرض تنش، می‌گردد (Jin *et al*., 2010; Leterrier *et al*., 2012; Hasanuzzaman and Fujita, 2013; Farnese *et al*., 2013; Talukdar, 2013). این امر از طریق القای فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان صورت می‌گیرد (Singh *et al*., 2009; Hao and Zhang, 2011; Gill *et al*., 2013). علی‌رغم مطالعات صورت گرفته، تاکنون نقش NO در پاسخ گیاهان به فلزات مختلف، کاملاً مشخص نشده است و نتایج متفاوتی در این زمینه وجود دارد (Arasimowicz–Jelonek *et al*., 2011) و اطلاعات محدودی در مورد نقش NO در هنگام مواجه با تنش شبه فلزاتی مانند آرسنیک در گیاهان بیش انباشتگر، وجود دارد (Xu *et al*., 2010; Souri and Karimi, 2017).

در مطالعاتی که تاکنون صورت گرفته است مشخص شده است که گیاه *I. cappadocica*، توانایی منحصر به فردی در مقاومت به آرسنیک دارد. اما از سوی دیگر در غلظت‌های بالا، مهار رشد و برخی علائم سمیت مشاهده شده (Karimi and Souri, 2015; Karimi and Souri, 2016; Souri *et al*., 2017; Souri *et al*., 2018)، که این امر می‌تواند تا حدودی باعث ایجاد محدودیت در استفاده از این گونه بیش انباشتگر گردد. از این‌رو ضرورت یافتن راه حل برای رفع این مشکل، در جهت افزایش توان مقاومتی گیاه در برابر فلزات سمی، بدیهی به نظر می‌رسد. با توجه به مطالب فوق و اهمیت نقش NO به عنوان یک ترکیب مؤثر در برابر تنش فلزات سنگین، این پژوهش به منظور بررسی نقش کاربرد خارجی NO بر پاسخ‌های فیزیولوژیک و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گیاه *I. cappadocica*، تحت تنش آرسنیک، صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

کشت گلدانی و اعمال تیمارها: بذرهای گیاه *I. cappadocica* از منطقه معدنی آلوده به آرسنیک زرشوران، جایی‌که دامنه غلظت آرسنیک در خاک بین ۱۴۵ تا ۶۵۲۵ میلی‌گرم بر کیلو گرم گزارش شده است (Karimi *et al*., 2010)، جمع‌آوری گردید. ابتدا بذرهای گیاه با سدیم هیپو کلرایت ۱٪ ضد عفونی و سپس با آب‌مقطر شستشو شدند. بذرهای استریل‌شده در داخل گلدان‌هایی که از قبل با پرلیت و ماسه به نسبت ۲ به ۱ پر شده قرار گرفت، سپس گلدان‌ها به گلخانه دانشگاه رازی کرمانشاه، با شرایط محیطی نیمه کنترل‌شده با دمای متناوب ۱۸–۲۵ درجه سانتی‌گراد (شب و روز)، رطوبت نسبی ۴۵ درصد، تناوب نوری ۱۶ ساعت نوری و ۸ ساعت تاریکی و شدت نوری حدود ۱۵۰ میکرومول فوتون در متر مربع، انتقال داده شدند. پس از جوانه‌زنی، گلدان‌ها هر هفته با محلول غذایی تغییر یافته هوگلند (Karimi *et al*., 2009)، 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 میکرومولار $CuSO_4$، ۵۰ میکرومولار FeEDTA، ۰/۲ میکرومولار $NaMoO_4$. پس از رسیدن به مرحله چهار برگی، گلدان‌ها به گروه‌های سه گلدانی (هر تیمار سه تکرار) تقسیم شدند و در هر مرحله به صورت جداگانه توسط آرسنات سدیم با غلظت‌های صفر، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میکرومولار به همراه غلظت ۲۰۰ میکرومولار SNP به عنوان آزادکننده NO، مورد تیمار قرار گرفتند. جهت انجام تیماردهی، ابتدا محلول‌های استوک غلیظ از دو ماده آرسنات سدیم و سدیم نیترو پروساید تهیه شد و میزان مورد نیاز برای هر تیمار به محلول غذایی هوگلند اضافه گردید. در هر بار اضافه‌کردن هوگلند و انجام تیمار به منظور جبران مقدار آب تبخیر شده و عدم تجمع یون‌ها، آب زیر گلدانی‌ها با آب‌مقطر جبران گردید. به منظور جلوگیری از تغییر غلظت تیمارها، محلول غذایی لازم برای تغذیه تیمارها دو بار در هفته مورد تعویض قرار می‌گرفت.

بعد از دو هفته، گیاهان داخل گلدان‌ها برداشت شدند و به دو بخش مجزا تقسیم شدند. یک بخش از آن‌ها برای اندازه‌گیری وزن خشک و محتوی آرسنیک مورد استفاده قرار گرفتند و بخشی دیگر جهت اندازه‌گیری پارامترهای فیزیولوژیکی به فریزر ۷۰- منتقل شدند.

آرسنیک: جهت اندازه‌گیری غلظت آرسنیک در نمونه‌های گیاهی از روش هضم اسیدی (Meharg and Jardine, 2003) استفاده شد. مقدار ۰/۱ گرم از نمونه‌های خشک‌شده با ۱

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.41.3.3]

میلی‌لیتر اسید نیتریک غلیظ مخلوط گردید. پس از نگهداری مخلوط حاصل به مدت ٢٤ ساعت در دمای اتاق، ۱ میلی‌لیتر آب اکسیژنه به هر لوله اضافه شد. در مرحله بعد لوله‌های آزمایش در بن‌ماری با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد، به مدت نیم ساعت قرار گرفتند. سپس به دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد، یک ساعت تا بخارشدن کل اسید نیتریک موجود در نمونه، منتقل شدند. پس از سردشدن، محلول حاصل صاف گردید و با آب مقطر به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسید. سپس به ۱ میلی‌لیتر از محلول رقیق‌شده هر یک از نمونه‌ها ۵ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۱۰ درصد، ۵ میلی‌لیتر یدید پتاسیم ۱۰ درصد و ۵ میلی‌لیتر اسید آسکوربیک ۵ درصد اضافه گردید. درنهایت آرسنیک موجود در نمونه‌ها به وسیله دستگاه طیف‌سنج جذب اتمی (Shimadzu, 6200) به همراه تولید هیدرید (FIG 100) اندازه‌گیری شد.

کلروفیل: برای اندازه‌گیری میزان کلروفیل *a*، *b* و کلروفیل کل از روش Arnon (١٩٤٩) استفاده گردید. استخراج کلروفیل از برگ توسط استن ۸۰ درصد صورت گرفت. مقدار ۰/۲ گرم از بافت تر برگ هر کدام از تیمارها وزن شد. ساییدن برگ با استن و تا حصول یک محلول سبز رنگ ادامه یافت. سپس حجم محلول با استن به ۲۰ میلی‌لیتر رسید. محلول حاضر به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ٤٠٠٠ دور و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. پس از آن جذب محلول رویی به وسیله دستگاه اسپکترفتومتر در طول‌موج‌های ٦٤٥ و ٦٦٣ نانومتر ثبت گردید و درنهایت به منظور محاسبه کلروفیل *a*، *b* و کلروفیل کل از روابط ۱، ۲ و ۳ استفاده شد.

رابطه ۱:

$$\text{Chlorophyll } a \text{ (mg/g F.W)} = (12.7 \times A_{663} - 2.6 \times A_{645})$$

رابطه ۲:

$$\text{Chlorophyll } b \text{ (mg/g F.W)} = (22.9 \times A_{645} - 4.68 \times A_{645})$$

رابطه ۳:

$$\text{Total chlorophyll (mg/g F.W)} = \text{Chlorophyll } a + \text{Chlorophyll } b$$

پراکسید هیدروژن: برای تعیین محتوی پراکسید هیدروژن، از روش Sergiev و همکاران (۱۹۹۷) با اندکی تغییر استفاده شد. ۰/۲ گرم از بافت برگی با ۳ میلی‌لیتر تری‌کلرو استیک اسید (TCA) ۰/۱ درصد در هاون چینی ساییده شد و عصاره حاصل در ۱۲۰۰۰ دور، به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از مایع رویی برداشته و به ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار و ۱ میلی‌لیتر یدید پتاسیم ۱ مولار اضافه گردید. جذب مخلوط ذکرشده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول‌موج ۳۹۰ نانومتر خوانده شد. درنهایت میزان H_2O_2 براساس قانون بیر لامبرت و با استفاده از ضریب خاموشی (۲۸ mM^{-1} cm^{-1}) محاسبه و به صورت میکرومول بر گرم وزن تر بیان گردید.

مالون دی‌آلدهید (MDA): برای اندازه‌گیری میزان مالون دی‌آلدهید از روش Heath و Packer (١٩٦٨) استفاده شد. طبق این روش ۰/۱ گرم برگ تازه در هاون چینی، حاوی ۵۰۰ میلی‌لیتر TCA ۰/۱ درصد سائیده شد. عصاره حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰۰، سانتریفیوژ گردید. در مرحله بعد ۲۵۰ میکرولیتر از محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ با ۷۵۰ میکرولیتر محلول مالون دی‌آلدهید که حاوی TCA ۲۰ درصد و تیو باربیتوریک اسید (TBA) ۰/۵ درصد بود، مخلوط گردید. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد در بن‌ماری قرار داده شد. سپس بلافاصله در یخ سرد شده و دوباره به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. میزان جذب این محلول با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول‌موج ۵۳۲ نانومتر، خوانده شد. جذب بقیه رنگیزه‌های غیراختصاصی در ٦٠٠ نانومتر تعیین و از مقدار حاصل کسر گردید. برای محاسبه میزان مالون دی‌آلدهید از ضریب خاموشی (۱۵۵ mM^{-1} cm^{-1}) و با استفاده از رابطه ٤ محاسبه شد.

رابطه ٤:

$$\text{MDA } (\mu\text{mol } g^{-1} \text{ FW}) = [A532\text{-}A600/155] \times 1000$$

استخراج عصاره پروتئین کل و آنزیمی: جهت استخراج عصاره پروتئین و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، ۰/۱ گرم بافت برگی تازه در ۱ میلی‌لیتر بافر تریس- اسید کلریدریک (pH, ۷/۵) محتوی EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، DTT ۱ میلی‌مولار، آسکوربات ۱ میلی‌مولار، پلی وینیل پیرولیدین (PVP) ۵٪ (وزنی- حجمی) و Tritone X-100 ۲٪ (حجمی- حجمی) هموژن شد.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.41.3.3]

نمونه‌های هموژن‌شده در ۱۲۰۰۰g و دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. سپس فاز بالایی آن جهت خواندن میزان پروتئین وآنزیم‌های آنتی‌اکسیدان جدا و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای انجام مراحل بعدی نگهداری شد.

اندازه‌گیری محتوی پروتئین کل محلول: برای اندازه‌گیری غلظت پروتئین از روش Bradford (۱۹۷٦) استفاده شد. جهت تهیه معرف، مقدار ۰/۰۵ گرم کوماسی بریانت بلو G250 در ۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۹٦ درصد در تاریکی به خوبی حل گردیده و سپس ۲۵ میلی‌لیتر اسید فسفریک ۸۵ درصد را قطره قطره به مخلوط فوق اضافه کرده و پس از هم‌زدن، حجم نهایی محلول با آب‌مقطر به حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر رسید. برای اندازه‌گیری غلظت پروتئین هر نمونه، ۵۰ میکرولیتر عصاره استخراج‌شده به ۲/۵ میلی‌لیتر معرف کوماسی‌بلو تازه افزوده شد و سپس جذب نوری در طول‌موج ۵۹۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. غلظت پروتئین در هر نمونه با توجه به جذب نمونه و با استفاده از منحنی استاندارد (براساس آلبومین سرم گاوی (BSA))، برادفورد به‌دست آمد.

آنزیم سوپراکسید دیسموتاز: برای اندازه‌گیری میزان فعالیت این آنزیم از روش Giannopolitis و Ries (۱۹۷۷) با اندکی تغییرات استفاده شد. اندازه‌گیری براساس توانایی آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در متوقف‌کردن احیای فتوشیمیایی نیترو بلو تترازولیوم (NBT) توسط رادیکال‌های سوپراکسید در حضور ریبوفلاوین در نور صورت می‌گیرد، که در طی این واکنش نیترو بلو تترازولیوم دی‌فرمازان (NBTDF) تولید می‌شود. براساس این روش ۷۵ میکرولیتر از عصاره استخراج شده با ۲/۵ میلی‌لیتر محلول اندازه‌گیری سوپراکسید دیسموتاز که شامل ۰/۲ مولار بافر فسفات پتاسیم (pH, ۷/۵)، ۷۵ میکرو مولار NBT، ۱۳ میلی‌مولار ال- متیونین، ۰/۱ میلی‌مولار EDTA و ۲ میکرومولار ریبوفلاوین است، مخلوط گردید. جهت انجام واکنش، مخلوط مذکور به مدت ۱۰ دقیقه در زیر لامپ فلورسنت ٤۰ وات به فاصله ۳۵ سانتی‌متر قرار داده شد. با خاموش‌کردن لامپ واکنش متوقف و میزان جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول‌موج ٥٦۰ نانومتر خوانده شد. مقداری از آنزیم که بتواند تولید NBTDF را ۵۰ درصد بازداری کند، معادل یک واحد آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در نظر گرفته می‌شود. فعالیت ویژه آنزیم براساس واحد در میلی‌گرم پروتئین بیان گردید.

آنزیم کاتالاز: برای اندازه‌گیری میزان غلظت کمی این آنزیم، ۵۰ میکرولیتر از عصاره استخراج‌شده را با ۱ میلی‌لیتر محلول اندازه‌گیری کاتالاز که حاوی بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH, ۷) و آب اکسیژنه ۱۵ میلی‌مولار بود (Chance and Maehly, 1955)، مخلوط کرده و سپس جذب آن در طول‌موج ۲٤۰ نانومتر به مدت ۱ دقیقه، به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده گردید. میزان فعالیت ویژه آنزیم با در نظر گرفتن ضریب خاموشی (۳۹/٤ mM^{-1} cm^{-1}) برحسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه گردید.

آنزیم پراکسیداز: برای اندازه‌گیری میزان فعالیت این آنزیم از روش Chance و Maehly (۱۹۹۵) با اندکی تغییرات استفاده گردید. اندازه‌گیری براساس میزان اکسیدشدن گوایکول توسط این آنزیم انجام شد. در این روش ۷۵ میکرولیتر از عصاره استخراج‌شده را با ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول پراکسیداز که شامل ۱۳ میلی‌مولار گوایکول، آب اکسیژنه ۵ میلی‌مولار و بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH= ۷) بود، مخلوط کرده و به مدت ۱ دقیقه توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول‌موج ٤۷۰ نانومتر، جذب آن خوانده شد. میزان فعالیت ویژه آنزیم با در نظرگرفتن ضریب خاموشی (۲٦/٦ mM^{-1} cm^{-1}) برحسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه گردید.

آنزیم آسکوربات پراکسیداز: اندازه‌گیری فعالیت آنزیم براساس تبدیل آسکوربات به منودهیدرو آسکوربات در حضور H_2O_2 توسط آنزیم آسکوربات پراکسیداز است، که براساس روش Nakano و Asada (۱۹۸۱) با اندکی تغییرات انجام شد. براساس این روش۵۰ میکرولیتر از عصاره استخراج‌شده را با ۱ میلی‌لیتر محلول اندازه‌گیری آسکوربیک پراکسیداز که شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH, ۷)، ۰/۱ میلی‌مولار EDTA، ۰/۵ میلی‌مولار اسید آسکوربیک و ۰/۱۵ میلی‌مولار

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.41.3.3]

آب اکسیژنه بود، مخلوط کرده و سپس با اسپکتروفتومتر و در طول‌موج ۲۹۰ نانومتر، جذب آن خوانده شد. میزان فعالیت ویژه آنزیم با در نظرگرفتن ضریب خاموشی (۲/۸ $mM^{-1}\ cm^{-1}$) برحسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد.

آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز: برای سنجش میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز، از روش Foyer و Halliwell (۱۹۷۶) با اندکی تغییر استفاده گردید. در این روش به ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۲۵ میلی‌مولار (pH, ۷)، ۱۵۰ میکرولیتر گلوتاتیون اکسید (GSSG) ۵ میلی‌مولار و ۱۵۰ میکرولیتر NADPH ۱/۲ میلی‌مولار اضافه گردید و پس از اضافه‌کردن ۱۵۰ میکرولیتر عصاره استخراج‌شده، میزان فعالیت آنزیم در طول‌موج ۳۴۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر به مدت ۱ دقیقه خوانده شد. میزان فعالیت ویژه آنزیم با در نظر گرفتن ضریب خاموشی (۶/۲ $mM^{-1}\ cm^{-1}$) برحسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه گردید.

آنزیم گلوتاتیون اس ترانسفراز: برای سنجش میزان فعالیت این آنزیم، کمپلکس واکنشی شامل ۹۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار (pH, ۷)، ۴۵۰ میکرولیتر گلوتاتیون احیا (GSH) ۱ میلی‌مولار، ۱۰۰ میکرولیتر ۱-کلرو، ۲ و ۴- دی‌نیتروبنزن (CDNB) ۱ میلی‌مولار و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیمی استخراج شده (Rohman *et al.*, 2009)، تهیه گردید. سپس تغییرات جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۳۴۰ نانومتر در مدت ۱ دقیقه ثبت شد. میزان فعالیت ویژه آنزیم با در نظر گرفتن ضریب خاموشی (۹/۶ $mM^{-1}\ cm^{-1}$) برحسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه گردید.

آنالیز آماری: آزمایش در قالب فاکتوریل بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی، با سه تکرار طراحی و اجرا گردید. تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از این تحقیق با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS صورت گرفت. همچنین برای مقایسه میانگین‌ها، از آزمون دانکن استفاده گردید. نمودارها توسط نرم‌افزار Excel ترسیم شدند.

نتایج

اثر SNP و غلظت‌های مختلف آرسنیک بر پارامترهای رشد: نتایج تجزیه واریانس غلظت‌های مختلف آرسنیک (صفر، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میکرومولار) بر میزان وزن تر بخش هوایی در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار بوده، درحالی‌که میزان وزن تر ریشه در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار نمی‌باشد. حضور SNP در محیط رشد گیاه، باعث بهبود شاخص‌های مربوط به رشد گردید و اثر آن بر میزان وزن ریشه و وزن بخش هوایی در سطح ۰/۰۰۱ معنی‌دار است. اما اثر متقابل As و SNP بر پارامترهای رشد، در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار نمی‌باشد (جدول ۱).

همان‌طور که در جدول ۲ ملاحظه می‌گردد، به موازات افزایش سطوح آرسنیک در محیط، میزان پارامترهای رشد شامل وزن تر ریشه و وزن تر بخش هوایی روند کاهشی داشته است. این روند کاهشی در تیمار ۱۵۰۰ میکرومولار محسوس بود، به نحوی که میزان وزن تر ریشه و بخش هوایی به ترتیب ۲۳/۷ و ۳۵/۹ درصد نسبت به نمونه شاهد کاهش یافته است. میزان وزن تر ریشه در غلظت‌های مختلف آرسنیک معنی‌دار نبود، اما حضور SNP منجر به افزایش معنی‌دار این شاخص در تیمارهای ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار گردید. همچنین این افزایش معنی‌دار در تیمارهای فاقد آرسنیک (شاهد) نیز مشاهده شد. میزان وزن تر بخش هوایی تحت اثر غلظت‌های مختلف آرسنیک، دارای روند نسبتاً کاهشی بوده، که در حضور SNP، این روند کاهشی به‌طور نسبی بهبود یافته است، به‌طوری‌که افزایش میزان وزن تر بخش هوایی در غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار بیشتر مشهود است. بیشترین میزان وزن تر بخش هوایی در تیمارهای آرسنیک و SNP، مربوط به تیمار ۵۰۰ میکرومولار است، که ۱/۳ برابر کمترین میزان، مربوط به تیمار ۱۵۰۰ میکرومولار است (جدول ۲).

اثر SNP و غلظت‌های مختلف آرسنیک بر محتوی کلروفیل: با توجه به جدول ۳، نتایج آنالیز واریانس نشان داد که تغییرات محتوی رنگیزه‌های فتوسنتزی (کلروفیل *a*، کلروفیل *b* و کلروفیل کل) تحت تأثیر غلظت‌های مختلف آرسنیک در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار نمی‌باشد. از سوی دیگر اثر SNP بر محتوی رنگیزه‌های فتوسنتزی در سطح ۰/۰۰۱

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.41.3.3]

جدول ۱- جدول آنالیز واریانس اثر SNP و غلظت‌های مختلف As بر پارامترهای رشد ریشه و بخش هوایی گیاه *I. Cappadocica*

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		وزن ریشه	وزن بخش هوایی
As	۳	۰/۱۰۲ ns	۰/۵۰۸ *
SNP	۱	۲/۷۷ ***	۲/٤۷ ***
As × SNP	۳	۰/۰۱۲ ns	۰/۰۰٤ ns
خطا	۱٦	۰/۱۱٦	۰/۱۳۳
کل	۲۳		

*****، * و ns، به ترتیب نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۰۱، ۰/۰۵ و عدم‌وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.**

جدول ۲- تأثیر غلظت‌های مختلف آرسنیک و اثر SNP بر پارامترهای رشد (وزن تر ریشه و بخش هوایی) گیاه *I. cappadocica*

غلظت آرسنیک (میکرومولار)	غلظت سدیم نیتروپروساید (میکرومولار)	وزن تر ریشه (گرم/گیاه)	وزن تر بخش هوایی (گرم/گیاه)
۰	۰	۱/۲٤ ± ۰/۲۲^{b}	۲/۰۳ ± ۰/۲٤^{abc}
۰	۲۰۰	۱/۸٦ ± ۰/۲۱^{a}	۲/٦۳ ± ۰/۲۳^{a}
۵۰۰	۰	۱/۲ ± ۰/۲۰^{b}	۱/۸۳ ± ۰/۲۷^{bcd}
۵۰۰	۲۰۰	۱/۹۷ ± ۰/۰۹۵^{a}	۲/۵۰ ± ۰/۲۰^{ab}
۱۰۰۰	۰	۱/۱۷ ± ۰/۱٤^{b}	۱/۷٦ ± ۰/۱٤^{cd}
۱۰۰۰	۲۰۰	۱/۹۰ ± ۰/۲۵^{a}	۲/۳٦ ± ۰/۱۷^{abc}
۱۵۰۰	۰	۱/۰۰ ± ۰/۰٦۳^{b}	۱/۳ ± ۰/۲۰$^{a-d}$
۱۵۰۰	۲۰۰	۱/٦ ± ۰/۲٦^{ab}	۱/۹٦ ± ۰/۱۷^{d}

حروف مشابه در هر ستون بیانگر معنی‌دار نبودن اثر تیمارها بر میانگین پارامترهای رشد با استفاده از آزمون دانکن هستند.

جدول ۳- جدول آنالیز واریانس اثر SNP و غلظت‌های مختلف As بر محتوی رنگیزه‌های فتوسنتزی (کلروفیل *a*، *b* و کل) گیاه *I. cappadocica*

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		کلروفیل *a*	کلروفیل *b*	کلروفیل کل
As	۳	۱۷ ns	۰/۰۱ ns	۰/۱۷۵ ns
SNP	۱	۲/٦۳ ***	۰/۰۹۵ ***	۳/۷۲ ***
As × SNP	۳	۰/۰۳۱ ns	۰/۱۱ ns	۰/۰۷۸ ns
خطا	۱٦	۰/٤۹	۰/۰۰٤	۰/۰۷۲
کل	۲۳			

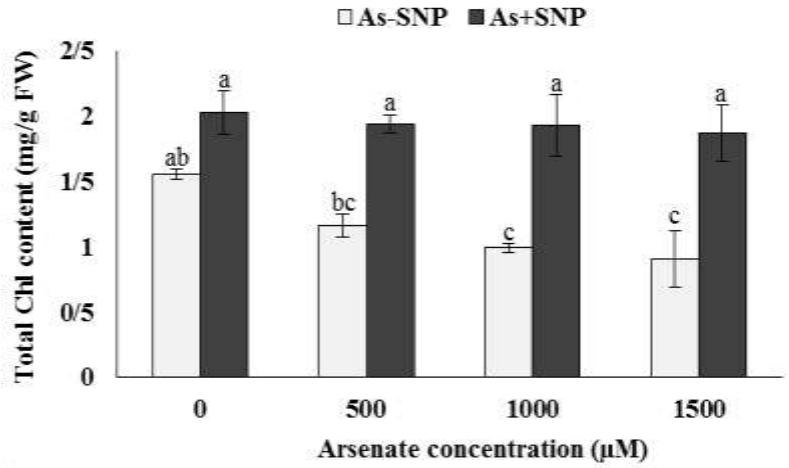
*****، * و ns، به ترتیب نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۰۱، ۰/۰۵ و عدم‌وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.**

معنی‌دار بوده درحالی‌که اثر متقابل As و SNP بر محتوی آن‌ها، در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار نیست.

با افزایش غلظت آرسنیک در محیط، محتوی کلروفیل کل (کلروفیل *a* + کلروفیل *b*) کاهش یافت، هر چند که این روند

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.41.3.3]



شکل ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف آرسنیک و SNP بر محتوی کلروفیل کل گیاه *I. cappadocica*. حروف مشابه بیانگر معنی‌دار نبودن اثر تیمارها بر میانگین محتوی کلروفیل کل با استفاده از آزمون دانکن هستند.

کاهشی در اغلب تیمارها معنی‌دار نبود (شکل ۱). علی‌رغم این‌که کم‌ترین میزان محتوی کلروفیل در تیمار ۱۵۰۰ میکرومولار آرسنیک، مشاهده گردید، اما این تیمار تفاوت معنی‌داری با سایر غلظت‌های آرسنیک نداشت. در تیمارهای حاوی SNP، محتوی کلروفیل افزایش یافت و از این حیث تفاوت معنی‌داری در مقایسه با تیمارهای فاقد SNP داشتند (شکل ۱). به عنوان مثال در تیمار ۱۰۰۰ میکرومولار حاوی SNP، محتوی کلروفیل کل ٤۹/۲ درصد نسبت به تیمار فاقد SNP، افزایش پیدا کردند. در تیمارهای آرسنیک و SNP، بیشترین محتوی کلروفیل کل مربوط به تیمار ۵۰۰ میکرومولار بود که ۲/۲ برابر کمترین میزان، مربوط به تیمار ۱۵۰۰ میکرومولار است.

اثر SNP و غلظت‌های مختلف آرسنیک بر میزان انباشت آرسنیک: با توجه به نتایج جدول آنالیز واریانس، میزان آرسنیک انباشت‌شده در بخش هوایی گیاه *I. cappadocica*، تحت اثر غلظت‌های مختلف آرسنیک و همچنین حضور SNP در سطح ۰/۰۰۱ معنی‌دار است. اثر متقابل As و SNP بر میزان انباشت در بخش هوایی در سطح ۰/۰۱ معنی‌دار بود (جدول ٤).

با افزایش غلظت آرسنیک در تیمارهای مختلف، میزان انباشت آرسنیک در بخش هوایی روندی افزایشی داشت و بالاترین میزان انباشت در تیمار ۱۵۰۰ میکرومولار مشاهده گردید و غلظت آرسنیک انباشت شده افزایش معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها داشت. در این تیمار، غلظت آرسنیک در بخش هوایی ۱۳۰۳/۹ میکروگرم بر گرم (بر پایه وزن خشک) بود. از سوی دیگر میزان این انباشت به واسطه حضور SNP، روند افزایشی معنی‌داری داشت و در تیمار ۱۵۰۰ میکرمولار، غلظت آرسنیک به ۱۸۵۸/۸ میکروگرم بر گرم (بر پایه وزن خشک) رسید (شکل ۲).

اثر SNP و غلظت‌های مختلف آرسنیک بر شاخص‌های تنش اکسیداتیو: با توجه به نتایج آنالیز واریانس (جدول ۵)، محتوی دو شاخص تنش اکسیداتیو شامل پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و مالون دی‌آلدهید (MDA)، تحت تأثیر غلظت‌های مختلف آرسنیک در سطح ۰/۰۰۱ معنی‌دار است. همچنین اثر SNP بر محتوی این دو شاخص در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار بوده درحالی‌که اثر متقابل As و SNP بر محتوی آن‌ها، در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار نمی‌باشد.

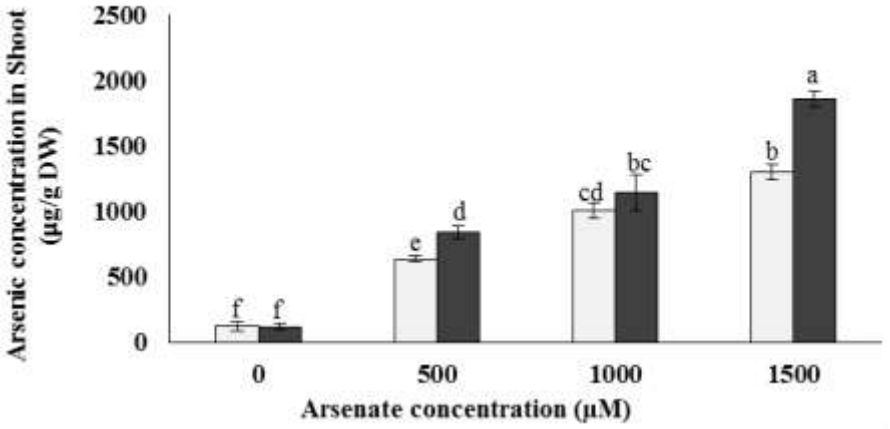
همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، روند مشابهی در تغییرات محتوی دو شاخص اکسیداتیو H_2O_2 و MDA در گیاه *I. cappadocica* وجود دارد. محتوی این دو شاخص تنش اکسیداتیو با افزایش غلظت آرسنیک در همه تیمارها افزایش یافت و بیشترین محتوی هر دو شاخص در تیمار ۱۵۰۰

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.41.3.3]

جدول ٤- جدول آنالیز واریانس اثر SNP و غلظت‌های مختلف As بر میزان انباشت آرسنیک در بخش هوایی گیاه *I. cappadocica*

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
		آرسنیک
As	۳	۲۲٤۸۳۸۷/۱ ***
SNP	۱	۲۹٦٤۹۷/۵ ***
As × SNP	۳	۸۵۰۱۱/۲ **
خطا	۱٦	۱۲۰۳۱/٦
کل	۲۳	

*****، ** و *، به ترتیب نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۰۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۵ است.**



شکل ۲- تأثیر غلظت‌های مختلف آرسنیک و SNP بر انباشت آرسنیک در بخش هوایی گیاه *I. cappadocica*. حروف متفاوت بیانگر معنی‌دار بودن اثر تیمارها بر میانگین محتوی آرسنیک در بخش هوایی با استفاده از آزمون دانکن هستند.

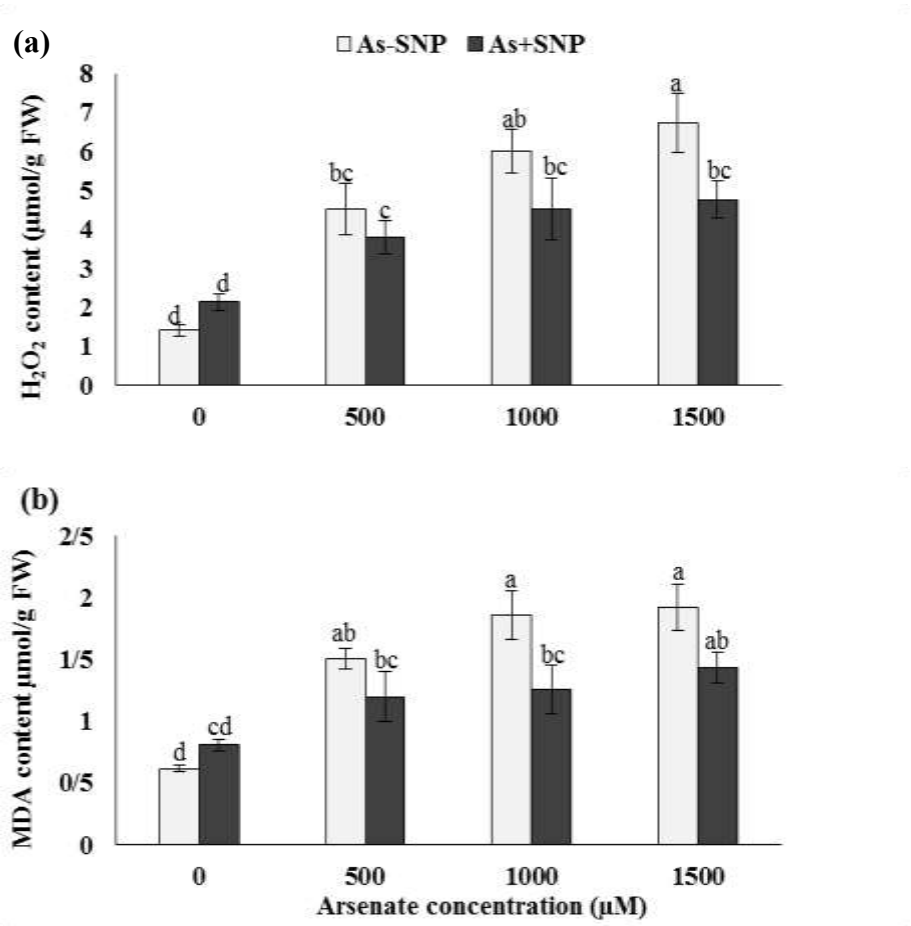
جدول ۵- جدول آنالیز واریانس اثر SNP و غلظت‌های مختلف As بر میزان شاخص‌های تنش اکسیداتیو در بخش هوایی گیاه *I. cappadocica*

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		H_2O_2	MDA
As	۳	۱۸/۸ ***	۱/۱ ***
SNP	۱	٤/٤ *	۰/۵۳ *
As × SNP	۳	۲/۰۷ ns	۰/۱۸ ns
خطا	۱٦	۰/۸۹	۰/۰٦۷
کل	۲۳		

*****، * و ns، به ترتیب نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۰۱، ۰/۰۵ و عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.**

میکرومولار مشاهده گردید، که میزان آن‌ها به ترتیب ٤/۸ و ۳/۱ برابر نمونه شاهد بود. به واسطه حضور SNP، محتوی MDA و H_2O_2، به ترتیب در تیمارهای ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میکرمولار به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. کاهش محتوی

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.41.3.3]



شکل ۳- تأثیر غلظت‌های مختلف آرسنیک و SNP بر محتوی پراکسید هیدروژن (H_2O_2) (a) و مالون دی‌آلدهید (MDA) (b) در بخش هوایی گیاه *I. cappadocica*. حروف متفاوت بیانگر معنی‌دار بودن اثر تیمارها بر میانگین محتوی H_2O_2 و MDA با استفاده از آزمون دانکن هستند.

جدول ٦- جدول آنالیز واریانس اثر SNP و غلظت‌های مختلف As بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (SOD، CAT، POD، APX، GR و GST) در بخش هوایی گیاه *I. cappadocica*

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات					
		GST	GR	APX	POD	CAT	SOD
As	۳	۸٤٦۱۸/٤***	۱۸۸٤۱۰۹/۸***	۲۰۵۷۰۳٤۹/۹***	٤۹۲/۸***	۱٤۲۸٦/٦***	۲۷٤۹/۸***
SNP	۱	۱۱٤۵۲/۸**	۱۱۷٦٤۰۱/۵**	۵۵۸۱۵٦۷/۵**	۲۳۷/۱*	۱۳۷٤۸/٤***	۱۱۵۸/٤*
As × SNP	۳	۱۱۲۸/۹ ns	۱٤٤٤۹۷/۵ ns	۵۷۱۷۱۸/۳ ns	۱۲/٤ ns	۲۰۲٦/۹**	۹۲/٦ ns
خطا	۱٦	۱۰٦۰/۱	۱۰۷۲۲۵/۷	٦۱٤٦۲۰/۷	۲۰/۹	۲۵٤/۹	۱۳٤/۳
کل	۲۳						

*****، **، * و ns، به ترتیب نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۰/۰۵ و عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.**

H_2O_2 در تیمار ۱۵۰۰ میکرومولار نسبت به تیمار فاقد SNP، ۲۹/۲ درصد بود. همچنین در همین تیمار محتوی MDA در حضور SNP، ۳۵/۵ درصد نسبت به تیمار فاقد SNP کاهش پیدا کرد.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.41.3.3]

اثر SNP و غلظت‌های مختلف آرسنیک بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان: با توجه به جدول ٦، نتایج آنالیز واریانس نشان داد که تغییرات میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شامل SOD، CAT، POD، APX، GR و GST تحت تأثیر غلظت‌های مختلف آرسنیک در سطح ۰/۰۰۱ معنی‌دار است. از سوی دیگر اثر SNP بر میزان فعالیت آنزیم CAT در سطح ۰/۰۰۱ و بر فعالیت آنزیم‌های SOD و POD در سطح ۰/۰۱ معنی‌دار بود. همچنین اثر SNP بر میزان فعالیت آنزیم‌های APX، GR وGST سطح ۰/۰۵ معنی‌دار است. اثر متقابل As و SNP بر میزان فعالیت آنزیم CAT در سطح ۰/۰۵ درصد معنی‌دار بوده درحالی‌که بر میزان فعالیت سایر آنزیم‌ها در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار نمی‌باشد.

با توجه به شکل ٤، به موازات افزایش سطوح آرسنیک در محیط میزان فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT، POD، APX، GR وGST روند افزایشی داشته است. این روند افزایشی در تیمار ۱۰۰۰ میکرومولار محسوس بود، به نحوی که میزان فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT، POD، APX و GR به ترتیب ۲/٦، ۳/٤، ۳/۵، ۵/٤ و ۲/۳ برابر نسبت به نمونه شاهد افزایش یافته است. از سوی دیگر میزان فعالیت این پنج آنزیم در تیمار ۱۵۰۰ میکرومولار آرسنیک روند کاهشی داشتند، درحالی‌که بیشترین میزان فعالیت آنزیم GST مربوط به تیمار ۱۵۰۰ میکرومولار است، که ٦/۸ برابر نسبت به نمونه شاهد افزایش داشته است. حضور SNP در تیمارها، منجر به افزایش بیشتر فعالیت آنزیم‌های مذکور گردید. به عنوان مثال میزان فعالیت آنزیم SOD به واسطه حضور SNP، روند افزایشی داشت و بیشترین اثر آن در تیمار ۱۰۰۰ میکرمولار مشاهده شد، که میزان فعالیت آن ۳۱/۷ درصد نسبت به تیمار فاقد SNP افزایش پیدا کرد. همچنین این روند درصد افزایش در حضور SNP نسبت به تیمارهای فاقد SNP برای آنزیم‌های SOD، CAT، POD، APX و GR به ترتیب ۹۱/۷، ۲۵/۹، ۳٤/۵ و ٤۸/۳ درصد بود (شکل ٤).

بحث

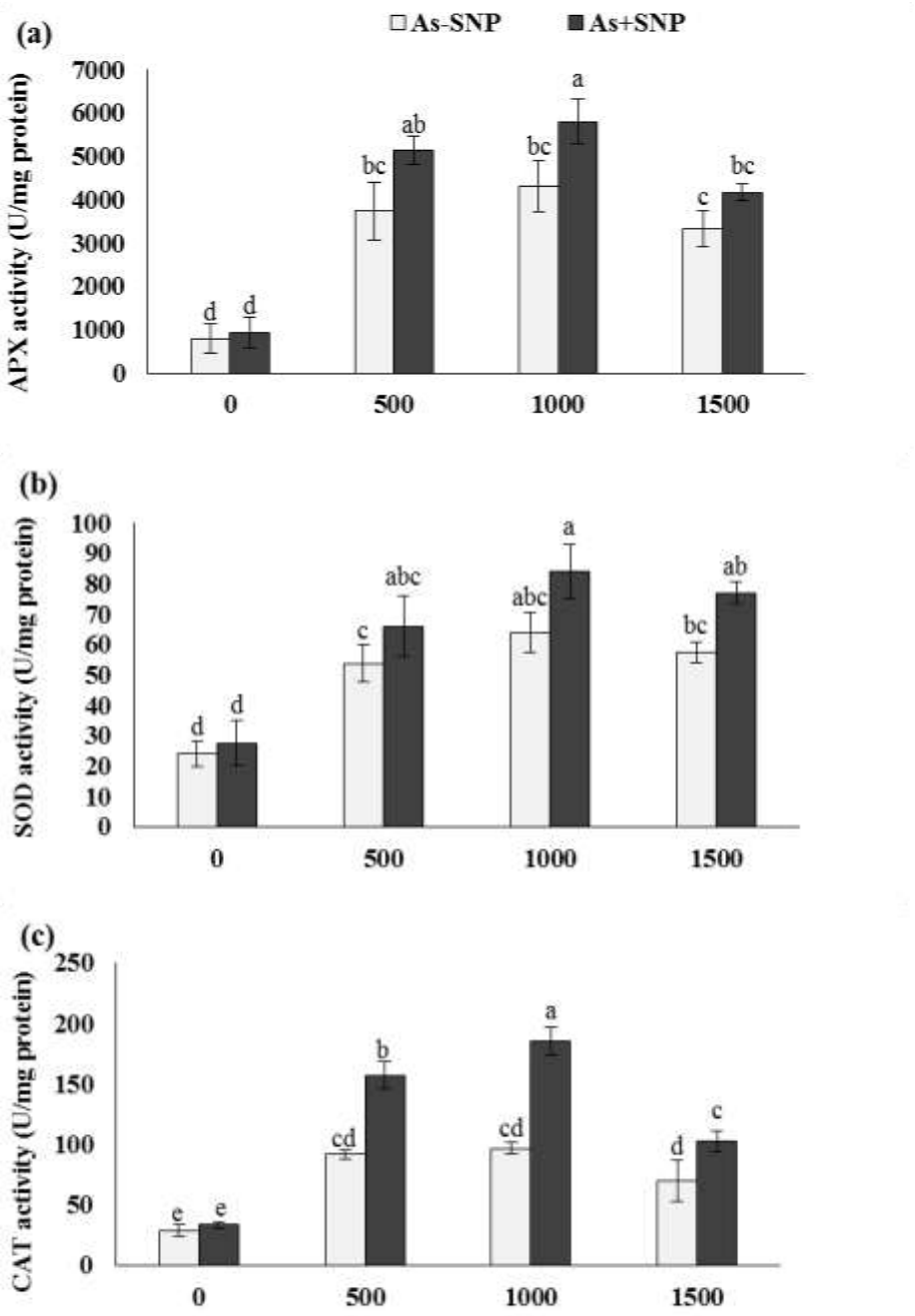
نتایج حاصل از این مطالعه نشان دادند که سطوح بالای آرسنیک باعث ایجاد تنش و در نتیجه کاهش رشد گیاه *I. cappadocica*، می‌گردد. مطالعات مختلفی نشان داده‌اند که تنش فلزات سنگین در گیاهان باعث ایجاد طیف وسیعی از تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی می‌گردد، که روند این تغییرات به عوامل مختلفی از جمله میزان حساسیت و یا تحمل گیاه به فلز، نوع فلز و مدت زمان در معرض قرار گرفتن گیاه، بستگی دارد. کاهش رشد و تغییر در پارامترهای مربوط به رشد، به عنوان یک پاسخ عمومی در برابر تنش فلزات محسوب می‌شود، که در اغلب گونه‌های گیاهی گزارش شده است (Tu and Ma, 2004; Jung *et al*., 2017; Souri *et al*., 2018; Rodriguez-Ruiz *et al*., 2018). در خصوص روند کاهشی مشاهده شده در سطوح بالای آرسنیک، گزارش‌های متعددی بیان شده که غلظت بالای آرسنیک موجب کاهش پارامترهای رشد ریشه و بخش هوایی در گیاهانی مانند *Pisum sativum* (Rodriguez-Ruiz *et al*., 2018)، *Mustard* (Shaibur and Kawai, 2010)، *Spinach* برنج (Jung *et al*., 2017) لوبیا (Stoeva *et al*., 2005)، سورگوم (Shaibur *et al*., 2008) و سرخس بیش انباشتگر آرسنیک *Pteris vittata* (Drava *et al*., 2012) می‌شود، که در توافق با نتایج به‌دست آمده از این تحقیق و همچنین مطالعات قبلی در ارتباط با گیاه *I. cappadocica* است (Karimi and Souri, 2013; Karimi and Souri, 2015; Karimi and Souri, 2016; Souri *et al*., 2018).

از سوی دیگر در تحقیقات صورت گرفته بر روی گیاه *I. cappadocica* تحت شرایط تنش آرسنیک مشخص گردیده که رشد این گیاه در غلظت‌های مختلف آرسنیک (کمتر از ۱۲۰۰ میکرومولار)، کاهش نیافته و از توانایی بالایی جهت مقابله با آرسنیک برخوردار است، که همسو با نتایج حاضر بر روی پارامترهای رشد می‌باشد (Karimi and Souri, 2013; Karimi and Souri, 2015; Karimi and Souri, 2016; Souri *et al*., 2018).

بر طبق نتایج به‌دست آمده از این پژوهش، کاربرد خارجی

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]

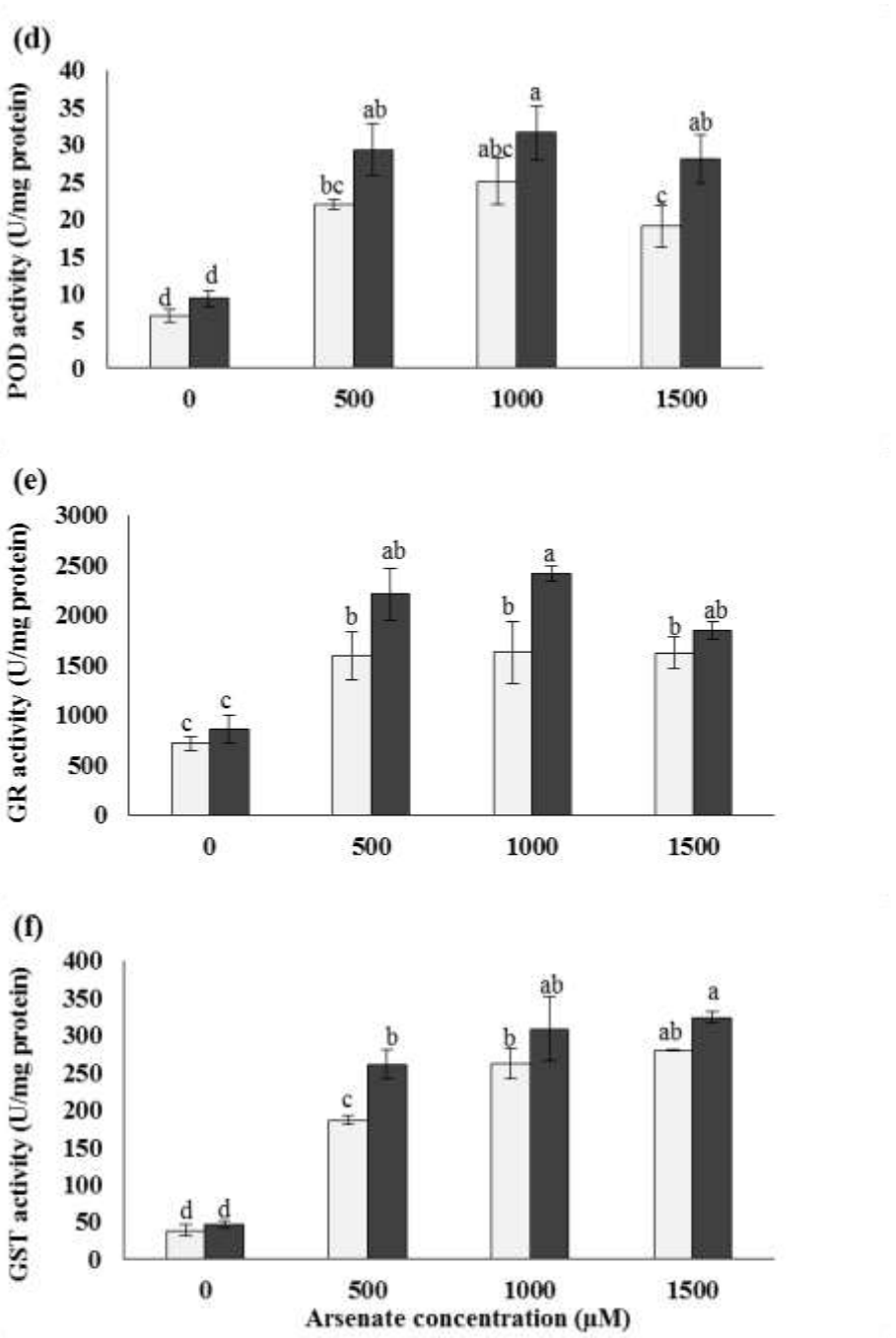
[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.41.3.3]



شکل ٤- تأثیر غلظت‌های مختلف آرسنیک و اثر SNP بر فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز (APX) (a) سوپراکسید دیسموتاز (SOD) (b)، کاتالاز (CAT) (c)، در بخش هوایی گیاه *I. cappadocica*. حروف متفاوت بیانگر معنی‌دار بودن اثر تیمارها بر میانگین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان با استفاده از آزمون دانکن هستند.

ترکیب SNP به عنوان‌دهنده NO، باعث کاهش اثرات سمی غلظت‌های بالای آرسنیک بر رشد گیاه *I. cappadocica* شد. این اثر مثبت NO، به خوبی در جریان بهبود پارامترهای رشد و همچنین کاهش علائم سمیتی در مراحل مختلف تیمارهای مورد مطالعه، مشاهده گردید. پارامترهای رشد ریشه و بخش هوایی تحت اثر تیمارهای آرسنیک، دارای روند کاهشی بودند که در حضور SNP، این روند کاهشی بهبود پیدا کرد. مشابه با نتایج ما، بهبود پارامترهای رشد در حضور SNP در گیاهان

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.41.3.3]



ادامه شکل ٤- تأثیر غلظت‌های مختلف آرسنیک و اثر SNP بر فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز (POD) (d)، گلوتاتیون ردوکتاز (GR) (e) و گلوتاتیون اس-ترانسفراز (GST) (f) در بخش هوایی گیاه *I. cappadocica*. حروف متفاوت بیانگر معنی‌دار بودن اثر تیمارها بر میانگین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان با استفاده از آزمون دانکن هستند.

تحت تیمار آرسنیک (Singh *et al*., 2009; Zhang *et al*., 2011; Namdjoyan and Kermanian, 2013; Singh *et al*., 2013; Shukla *et al*., 2015; Praveen and Gupta, 2018) گزارش شده است.

محتوی کلروفیل کل (کلروفیل *a* + کلروفیل *b*) با افزایش سطوح آرسنیک در محیط به‌طور نسبی کاهش یافت. تغییر عملکرد فرایند فتوسنتز به عوامل متعددی از جمله تغییر در فعالیت روزنه‌ها، اختلال در ساختار تیلاکوئیدی کلروپلاست‌ها،

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.41.3.3]

مختل‌شدن پروسه زنجیره انتقال الکترون و اختلال در عملکرد فتوسیستم‌ها بستگی دارد (Kaur *et al*., 2018). مطالعات انجام شده بر روی گندم و لوبیا نشان داده است که کلروز ایجاد شده در این گیاهان، نتیجه القای تنش اکسیداتیو توسط آرسنیک بوده، که منجر به کاهش محتوی کلروفیل برگ‌ها و تغییر شکل کلروپلاست می‌گردد (Liu *et al*., 2018).

در این تحقیق، کاربرد خارجی SNP، منجر به افزایش محتوی کلروفیل در غلظت‌های مختلف آرسنیک گردید. نتایج نشان دادند که در تیمارهای حاوی SNP، محتوی کلروفیل کل افزایش یافت و از این حیث تفاوت معنی‌داری در مقایسه با تیمارهای فاقد SNP وجود داشت. این نتایج پیشنهاد می‌کنند که احتمالاً NO نقش مؤثر را در حفاظت از سیستم فتوسنتزی گیاه در مواجه با تنش آرسنیک، ایفا می‌کند. تأمین غلظت مناسب عناصر مغذی و به ویژه آهن جهت حفظ عملکرد فرایند فتوسنتز، از عوامل کلیدی در بهبود فتوسنتز در گیاهان تحت تنش محسوب می‌شود، که این مهم توسط NO صورت می‌گیرد (Zhang *et al*., 2011). به علاوه مشخص شده است که ارتباط نزدیکی بین محتوی رنگیزه‌های فتوسنتزی و پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی وجود دارد (کریمی و سوری، ١٣٩٤). از این رو کاهش محتوی MDA به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدها در نمونه‌های تحت تیمار با SNP می‌تواند توجیه مناسبی برای افزایش محتوی کلروفیل در گیاه باشد. گزارشاتی مبنی بر نقش حفاظتی NO در فرایند فتوسنتز و افزایش محتوی رنگیزه‌های فتوسنتزی در گیاهانی مانند برنج (Singh *et al*., 2015) و *Hordeum vulgare* (Shukla *et al*., 2015) تحت تنش آرسنیک وجود دارند، که تأییدی بر نتایج حاصل از این تحقیق هستند.

نتایج بدست آمده از بررسی میزان انباشت فلزات مورد مطالعه در بخش هوایی نشان دادند که با افزایش غلظت فلز در تیمارهای مختلف، میزان انباشت آرسنیک روندی افزایشی داشت. در گیاهان مقاوم توانایی انتقال آرسنیک به بخش هوایی، به منظور کارآمدی فرایند سمیت‌زدایی آرسنیک، بسیار حائز اهمیت است (Singh and Ma, 2006; Karimi and Souri, 2015; 2016; Souri *et al*., 2017; Souri *et al*., 2018). همان‌طورکه انتظار می‌رفت، گیاه بیش انباشتگر *I. cappadocica*، در جذب آرسنیک بسیار کارآمد عمل کرد و بیش از ۱۳۰۰ میکروگرم بر گرم آرسنیک (بر پایه وزن خشک) را در بخش هوایی خود انباشت کرد، که این امر نشان‌دهنده مقاومت بالای این گیاه نسبت به آرسنیک و وجود مکانیسم‌های کارآمد در آن به منظور سمیت‌زدایی آرسنیک است. بجز نتایج بدست آمده در ارتباط با توانایی منحصر به فرد گیاه*I. cappadocica* در انباشت آرسنیک به ویژه در بخش هوایی (Karimi *et al*., 2009; Karimi *et al*., 2010; Karimi and Souri, 2013; Karimi and Souri, 2015; Karimi and Souri, 2016; Souri *et al*., 2018)، مطالعات انجام شده بر روی گیاهانی مانند *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 هستند.

حضور SNP باعث افزایش بیشتر میزان انباشت آرسنیک گردید و به نظر می‌رسد که NO آزاد شده از SNP، نقش مؤثری در ارتباط با افزایش پتانسیل انباشتگری در گیاه *I. cappadocica*، ایفا می‌کند. این افزایش جذب و تجمع صورت گرفته به واسطه SNP، می‌تواند به دلیل تحت تأثیر گرفتن عوامل مختلفی از مورفولوژی ریشه، مانند جذب آرسنیک، کده‌بندی در ریشه و کارآیی فرایند انتقال از ریشه به بخش هوایی، باشد. به‌طورکلی نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که SNP خارجی باعث میزان جذب و انباشت آرسنیک در گیاه *I. cappadocica*، شده است، که این نتایج در تناقض با مطالعات قبلی در جو (Shukla *et al*., 2015)، علف چشمه (Namdjoyan and Kermanian, 2013) و Luffa (Singh *et al*., 2013) است. البته در اغلب این گیاهان از طریق مکانیسم اجتناب، مانع ورود یون‌های فلزی به درون بافت‌های خود می‌شوند و NO از طرق مختلف می‌تواند باعث تقویت این مکانیسم گردد (Singh *et al*., 2009; Namdjoyan and Kermanian, 2013). از این رو احتمالاً اثر حفاظتی SNP در گیاه *I. cappadocica* در برابر غلظت‌های بالای آرسنیک، مربوط به مکانیسم اجتناب نمی‌باشد. از آنجایی‌که مکانیسم‌های

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.41.3.3]

مقاومت و سمیت‌زدایی در گیاهان بیش انباشتگر با سایر گیاهان متفاوت است و یکی از مهم‌ترین استراتژی‌های کاربردی در این گیاهان سنتز لیگاندهایی با وزن مولکولی پایین نظیر گلوتاتیون و فیتوکلاتین‌ها است (Karimi *et al*., 2009)، به نظر می‌رسد که NO آزاد شده از SNP، از طریق فعال‌کردن مسیرهای سیگنالینگ باعث افزایش سنتز این ترکیبات می‌گردد. همچنین نقش NO در القای سیستم آنتی‌اکسیدانی و به تبع آن کاهش تنش اکسیداتیو ناشی از حضور فلزات سنگین، به افزایش مقاومت گیاهان بیش انباشتگر کمک می‌کند، که این امر نیز به نوبه خود فرایندهای دخیل در جذب و انتقال یون‌های فلزی را تحت تأثیر قرار دهد (Souri *et al*., 2018).

محتوی دو شاخص تنش اکسیداتیو شامل H_2O_2 و MDA با افزایش غلظت فلز در همه تیمارها، افزایش یافت و نکته قابل توجه، تشابه روند تغییرات محتوی H_2O_2 و MDA در گیاه *I. cappadocica* است، که در طی تنش آرسنیک به موازات یکدیگر افزایش یافتند. پایین‌تر بودن محتوی H_2O_2 در تیمارهای ۵۰۰ میکرومولار آرسنیک، می‌تواند مربوط به فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بوده و حذف H_2O_2 در بخش هوایی گیاه *I. cappadocica* به نحو بهتری صورت گرفته است. تولید H_2O_2 در بافت‌های مختلف گیاهی به عنوان یک مولکول با نقش دوگانه، در پاسخ به گستره وسیعی از تنش‌ها از جمله تنش فلزات سنگین افزایش می‌یابد افزایش میزان انواع ROS از جمله H_2O_2، به عنوان عامل اصلی محدودیت تولید محصول گیاهی و متابولیسم سلولی را از طریق پراکسیداسیدن لیپیدها، واسرشته کردن پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک، برهم می‌زنند (Demidchik, 2015). مشخص شده است که تنش آرسنیک باعث تشکیل انواع ROS و در نتیجه پراکسیداسیون لیپیدها می‌گردد (Singh *et al*., 2007; Souri *et al*., 2018). القای تنش اکسیداتیو در حضور آرسنیک و افزایش محتوی H_2O_2 و MDA در گیاهانی مانند برنج (Shri *et al*., 2009)، گندم (Chun-Xi *et al*., 2007) و سرخس *P. vittata* (Ma *et al*., 2006) گزارش شده است، که همگی در توافق با نتایج حاصل از این تحقیق هستند.

حضور SNP باعث کاهش محتوی هر دو شاخص تنش اکسیداتیو در سطوح مختلف آرسنیک گردید. مولکول NO از طریق واکنش با فلزات واسطه و کاهش واکنش‌های فنتون که در طی آن رادیکال‌های آزادی مانند H_2O_2 تولید می‌شود، از گیاه در برابر تنش اکسیداتیو محافظت می‌کند (Hsu and Kao, 2004; Sahay and Gupta, 2017). همچنین NO در متابولیسم ROS شرکت می‌کند و اثر آنتی‌اکسیدانی آن از طریق واکنش‌هایی که با رادیکال‌های آزاد دارد، به خوبی به اثبات رسیده است. به علاوه NO در افزایش پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی که در طی تنش فلزات سنگین صورت می‌گیرد، نقش مهمی را ایفا می‌کند و از این طریق نیز منجر به کاهش تنش اکسیداتیو می‌گردد (Sahay and Gupta, 2017). پیشنهاد شده است که نقش NO در جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی، به دلیل واکنش این مولکول با رادیکال لیپید آلکوسیل و لیپید پراکسیل و متوقف کردن زنجیره پراکسیداسیون است (Zhu *et al*., 2006). نقش NO در کاهش شاخص‌های اکسیداتیو و جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدها در گیاهان تحت تنش آرسنیک مانند برنج (Singh *et al*., 2015)، لوبیا (Talukdar, 2013) و جو (Shukla *et al*., 2015) ثابت شده است، که همسو با نتایج بدست آمده از این تحقیق می‌باشد.

نتایج حاصل از بررسی فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی نشان دادند که با افزایش سطوح آرسنیک محیط، میزان فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT، POD، APX، GR وGST در گیاه *I. cappadocica* افزایش یافت، در حالی‌که میزان فعالیت آنزیم‌های مذکور (بجز آنزیم GST) در تیمار ۱۵۰۰ میکرومولار آرسنیک روند کاهشی پیدا کردند.

کنترل میزان رادیکال سوپراکسید (O_2^-) در سطح پایه، به وسیله آنزیم SOD، یک سازوکار حفاظتی مهم در برابر تنش اکسیداتیو می‌باشد، زیرا O_2^- به عنوان پیش‌ساز اکثر مشتقات انواع اکسیژن فعال یا سمی از قبیل H_2O_2 و OH^- عمل می‌کند، از این‌رو از آنزیم SOD به عنوان اولین خط دفاعی در برابر تنش اکسیداتیو نام برده می‌شود (Karimi and Souri, 2016). به نظر می‌رسد فعالیت بالای آنزیم SOD در تیمار ۱۰۰۰

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.41.3.3]

میکرومولار آرسنیک، به علت افزایش تنش اکسیداتیو والقای فعالیت آنزیم به منظور رفع سمیت ایجادشده در گیاه *I. cappadocica* می‌باشد. از سوی دیگر کاهش فعالیت آنزیم در غلظت ۱۵۰۰ میکرومولار آرسنیک، احتمالاً به دلیل تخریب ساختار پروتئینی آنزیم در اثر شدت تنش اکسیداتیو می‌باشد. افزایش فعالیت SOD تحت تنش آرسنیک در گونه‌های سرخس از جمله *P. vittata* گزارش شده است (Liu *et al*., 2009; Ye *et al*., 2009)، که با نتایج بدست آمده ار این پژوهش همسو است.

عملکرد اصلی آنزیم‌های CAT و POD تبدیل H_2O_2 به آب و اکسیژن می‌باشد. این دو آنزیم از عوامل اصلی سمیت زدایی رادیکال‌های آزاد اکسیژن در طی تنش اکسیداتیو محسوب می‌شوند (Mehla *et al*., 2017). افزایش فعالیت آنزیم POD در گیاهان، به عنوان یک پاسخ عمومی در برابر مقادیر سمی فلزات سنگین به شمار می‌آید (Sharma, 2012; Mehla *et al*., 2017). آنزیم POD می‌تواند با شرکت در بیوسنتز لیگنین‌ها، یک سد فیزیولوژیکی محکم در برابر فلزات سنگین ایجاد کند (Karimi and Souri, 2016; Mehla *et al*., 2017). بالابودن میزان فعالیت آنزیم POD در طی تنش آرسنیک، می‌تواند مربوط به نقش مهم این آنزیم در جلوگیری از گسترش تنش اکسیداتیو به وسیله افزایش بیوسنتز ترکیبات فنلی نظیر لیگنین در گیاه *I. cappadocica* باشد. آنزیم‌های APX و GR از آنزیم‌های مهم چرخه گلوتاتیون- آسکوربات هستند. در این تحقیق سطوح بالای آرسنیک در محلول غذایی، باعث افزایش چشمگیر میزان فعالیت آنزیم‌های APX و GR گردید، که این افزایش احتمالاً به دلیل اهمیت چرخه گلوتاتیون- آسکوربات در سمیت‌زدایی رادیکال‌های آزاد در طول تنش اکسیداتیو در گیاه *I. cappadocica* است. افزایش فعالیت آنزیم‌های APX و GR تحت تنش آرسنیک در *P. vittata* (Srivastava *et al*., 2005)، برنج (Shri *et al*., 2009) و لوبیا (Singh *et al*., 2007) گزارش شده، که با نتایج بدست آمده از این تحقیق موافق است.

آنزیم GST نقش مهمی در سمیت‌زدایی ترکیبات سمی (علف‌کش‌ها و فلزات سنگین)، هموستازی هورمون‌ها، تنظیم مرگ سلولی، کاهش تنش اکسیداتیو و پاسخ‌های مختلف گیاه به انواع تنش‌ها، دارد (Sharma, 2012; Kısa, 2017). آنزیم GST مشابه آنزیم GR برای عملکرد خود به GSH نیاز دارد و از آن به عنوان یک سوبسترا یا کوآنزیم استفاده می‌کند (Jozefczak *et al*., 2012; Kısa, 2017). وظیفه اصلی آنزیم GST در هنگام تنش فلزات سنگین، اتصال یون‌های فلزی با GSH و شرکت در حذف ROS می‌باشد (Jozefczak *et al*., 2012; Sandalio *et al*., 2012). بر طبق نتایج بدست آمده، فعالیت آنزیم GST در تمامی سطوح آرسنیک افزایش پیدا کرد و برخلاف سایر آنزیم‌ها، فعالیت این آنزیم در غلظت‌های بالای فلزات، نه تنها با کاهش مواجه نشد، بلکه افزایش نیز یافت. این مسأله بیانگر این مطلب است که به نظر می‌رسد القای فعالیت آنزیم GST در گیاه *I. cappadocica*، از اهمیت بالایی برخوردار است و این آنزیم نقش مهمی در کاهش سمیت سطوح بالای آرسنیک دارد. القای فعالیت آنزیم GST تحت تنش آرسنیک در ذرت (Mylona *et al*., 1998) و کهور (Mokgalaka-Matlala *et al*., 2009) مشاهده شده است، که در توافق با نتایج بدست آمده از این تحقیق است.

در حضور SNP، الگوی تغییرات آنزیم GST با سایر آنزیم‌ها متفاوت بود و بیشترین اثر SNP در تیمار ۱۵۰۰ میکرومولار آرسنیک مشاهده گردید. بررسی مطالعات قبلی نشان می‌دهند که به کار بردن NO به صورت خارجی، منجر به کاهش سمیت فلزات سنگین و افزایش مقاومت گیاهان مختلف در برابر تنش فلزات سنگین می‌گردد، که این امر به واسطه تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی مانند آنزیم‌های SOD، CAT، POD، APX، GR، GST و همچنین تجمع ترکیبات آنتی اکسیدانی، به منظور محدودکردن تنش اکسیداتیو و آسیب‌های ناشی از آن صورت می‌گیرد (Singh *et al*., 2009; Gill *et al*., 2013; Farnese *et al*., 2013; Hasanuzzaman and Fujita, 2013; Cerana and Malerba, 2015, Praveen and Gupta, 2018). مولکول NO با افزایش غلظت کلسیم سیتوسلی و تنظیم کانال‌های کلسیمی و ناقال‌های مربوطه، در

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.41.3.3]

شبکه آبشاری سیگنالینگ نقش داشته و از این طریق باعث تنظیم بیان ژن‌های مربوط به پاسخ‌های آنتی‌اکسیدان در شرایط تنش می‌گردد (Cerana and Malerba, 2015). نقش NO در افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاهان تحت تنش آرسنیک مانند برنج (Singh *et al*., 2015)، گندم (Hasanuzzaman and Fujita, 2013) و جو (Shukla *et al*., 2015) ثابت شده است، که همسو با نتایج بدست آمده از این تحقیق می‌باشد.

نتیجه‌گیری

بر طبق نتایج بدست آمده از این پژوهش، مقاومت به تنش آرسنیک در این گیاه *I. cappadocica*، به افزایش سیستم دفاعی اکسیداتیو که شامل آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌باشد، وابسته است و افزایش فعالیت آنزیم‌ها به ویژه آنزیم GST منجر به کاهش شاخص‌های تنش اکسیداتیو و افزایش رشد گیاه گردید. کاربرد خارجی ترکیب SNP به عنوان دهنده NO، باعث کاهش اثرات سمی غلظت‌های بالای آرسنیک بر رشد گیاه *I. cappadocica* شد. این اثر مثبت NO، به خوبی در جریان بهبود پارامترهای رشد، کاهش تنش اکسیداتیو و افزایش کارآیی سیستم آنتی‌اکسیدانی در تیمارهای مورد مطالعه، مشاهده گردید و NO با اثرات چند جانبه خود، نقش مهمی در کاهش اثرات منفی تنش داشت.

منابع

کریمی، ن. و سوری، ز. (۱۳۹٤) بررسی اثر متقابل آرسنیک و فسفر بر محتوی کلروفیل و میزان تجمع مالون دی‌آلدهید در گیاه *I. cappadocica*. مجله فرآیند و کارکرد گیاهی ٤: ۱-۱۲.

Arasimowicz-Jelonek, M., Floryszak-Wieczorek, J. and Gwozdz, E. A. (2011) The message of nitric oxide in cadmium challenged plants. Plant Science 181: 612-620.

Arnon, D. I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplast polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiology 24: 1-15.

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.

Cerana, R. and Malerba, M. (2015) Role of nitric oxide in heavy metal stress. In: Nitric Oxide Action in Abiotic Stress Responses in Plants. (eds. Khan, M., Mobin, M., Mohammad, F. and Corpas F.) Springer, Cham.

Chance, B. C. and Maehly (1995) Assay of catalase and peroxidase. Methods in Enzymology 11: 764-775.

Chun-xi, L., Shu-li, F., Yan, S. H., Li-na, J., Xu-yang, L. and Xiao-li, H. (2007) Effects of arsenic on seed germination and physiological activities of wheat seedlings. Journal of Environmental Sciences 19: 725-732.

Demidchik, V. (2015) Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. Environmental and Experimental Botany 109: 212-228.

Drava, G., Roccotiello, E., Minganti, V., Manfredi, A. and Cornara, L. (2012) Effects of cadmium and arsenic on *Pteris vittata* under hydroponic conditions. Environmental Toxicology and Chemistry 31: 1375-1380.

Emamverdian, A., Ding, Y., Mokhberdoran, F. and Xie, Y. (2015) Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response. The Scientific World Journal ID 756120,18.

Farnese, F. S., de Oliveira, J. A., Gusman, G. S., Leao, G. A., Ribeiro, C., Siman, L. I. and Cambraia, J. (2013) Plant responses to arsenic: the role of nitric oxide. Water, Air, and Soil Pollution 224: 1660.

Foyer, C. H. and Halliwell, B. (1976) The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. Planta 133: 21-25.

Giannopolitis, C. N. and Ries, S. K. (1977) Superoxide dismutase occurrence in higher plants. Plant Physiology 59: 309-314.

Gill, S. S., Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Macovei, A. and Tuteja, N. (2013) Importance of nitric oxide in cadmium stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry 63: 254-261.

Hao, G. P. and Zhang, J. H. (2010) The role of nitric oxide as a bioactive signaling molecule in plants under abiotic stress. In: Nitric Oxide in Plant Physiology (eds. Hayat, S., Mori, M., Pichtel, J. and Ahmad, A.) Pp.115-138. Wiley-VCH Verlag, Weinheim.

Hartley-Whitaker, J., Ainsworth, G. and Meharg, A. A. (2001) Copper-and arsenate-induced oxidative stress *in Holcus lanatus* L. clones with differential sensitivity. Plant, Cell and Environment 24: 713-722.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.41.3.3]

Hasanuzzaman, M. and Fujita, M. (2013) Exogenous sodium nitroprusside alleviates arsenic-induced oxidative stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings by enhancing antioxidant defense and glyoxalase system. Ecotoxicology 22: 584-596.

Heath, R. L. and Packer, L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts – Arch. Archives of Biochemistry and Biophysics 125: 189-198.

Hsu, Y. T. and Kao, C. H. (2004) Cadmium toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. Plant Growth Regulation 42: 227-238.

Jin, J. W., Xu, Y. F. and Huang, Y. F. (2010) Protective effect of nitric oxide against arsenic-induced oxidative damage in tall fescue leaves. African Journal of Biotechnology 9: 1619-1627.

Jozefczak, M., Remans, T., Vangronsveld, J. and Cuypers, A. (2012) Glutathione is a key player in metal-induced oxidative stress defenses. International Journal of Molecular Sciences 13: 3145-3175.

Jung, H., Lee, J., Chae, M. J., Kong, M. S., Lee, C. H., Kang, S. S. and Kim, Y. H. (2017) Growth-inhibition patterns and transfer-factor profiles in arsenic-stressed rice (*Oryza sativa* L.). Environmental Monitoring and Assessment 189: 638.

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

Karimi, N., Siyahat Shayesteh, L., Ghasmpour, H. and Alavi, M. (2013) Effects of arsenic on growth, photosynthetic activity and accumulation in two new hyperaccumulating populations of *Isatis cappadocica* Desv. Journal of Plant Growth Regulation 32: 823-830.

Karimi, N. and Souri, Z. (2013) Metabolic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in *Isatis cappadocica*. Iranian Journal of Plant Physiology 3: 785-792.

Karimi, N. and Souri, Z. (2015) Effect of phosphorus on arsenic accumulation and detoxification in Arsenic Hyperaccumulator, *Isatis cappadocica*. Journal of Plant Growth Regulation 34: 88-95.

Karimi, N. and Souri, Z. (2016) Antioxidant enzymes and compounds complement each other during arsenic detoxification in shoots of *Isatis cappadocica* Desv. Chemistry and Ecology 32: 937-951.

Kaur, P., Bali, S., Verma, V., Khanna, K., Ohri, P., Thukral, A. K., Vig, A. P. and Bhardwaj, R. (2018) Responses of photosynthesis under metal stress. In Environment and Photosynthesis: A Future Prospect.

Kısa, D. (2017) Expressions of glutathione-related genes and activities of their corresponding enzymes in leaves of tomato exposed to heavy metal. Russian Journal of Plant Physiology 64: 876-882.

Leterrier, M., Airaki, M., Palma, J. M., Chaki, M., Barroso, J. B. and Corpas, F. J. (2012) Arsenic triggers the nitric oxide (NO) and S-nitrosoglutathione (GSNO) metabolism in Arabidopsis. Environmental Pollution 166: 136-143.

Liu, S., Yanga, R., Tripathi, D. K., Li, X., Jianga, M., Lv, B., Ma, M. and Chen, Q. (2018) Signalling cross-talk between nitric oxide and active oxygen in *Trifolium repens* L. plants responses to cadmium stress. Environmental Pollution 239: 53-68.

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.

Liu, Y. Wang, H. B. Wong, M. H. and Ye, Z. H. (2009) The role of arsenate reductase and superoxide dismutase in As accumulation in four Pteris species. Environment International 35: 491-495.

Ma, Q. L., Singh, N., Srivastava, M. and Rathinasabapathi, B. (2006) Metabolic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in *Pteris vittata* L and *Pteris ensiformis* L. Plant Science 170: 274-282.

Maurya, A. K. and Rani, A. (2017) Nitric oxide (NO) and physio-biochemical adaptation in plants against stress. In: Plant Adaptation Strategies in Changing Environment. (eds. Shukla, V., Kumar, S. and Kumar, N.) Springer, Singapore.

Meagher, R. B. (2000) Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. Current Opinion in Plant Biology 3: 153-162.

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

Mehla, N., Sindhi, V., Josula, D., Bisht, P. and Wani, S. H. (2017) An introduction to antioxidants and their roles in plant stress tolerance. In: Reactive Oxygen Species and Antioxidant Systems in Plants: Role and Regulation under Abiotic Stress. (eds. Khan, M. and Khan, N.) Springer, Singapore.

Mokgalaka-Matlala, N. S., Flores-Tavizo'n, E., Castillo-Michel, H., Peralta-Videa, J. R. and Gardea-Torresdey, J. L. (2009) Arsenic tolerance in mesquite (Prosopissp.): Low molecular weight thiols synthesis and glutathione activity in response to arsenic. Plant Physiology and Biochemistry 47: 822-826.

Mosaferi, M., Mesdaghinia, A. R. and Yunesian, M. (2004) Measurement of arsenic in drinking water of Bijar city villages, Kurdistan, Iran. Speciation and Toxicity seminar, the research School of Earth Sciences at UCL-Birkbeck,

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.41.3.3]

UCL, London, UK.
Mylona, P. V., Polidoros, A. N. and Scandalios, J. G. (1998) Modulation of antioxidant responses by arsenic in maize. Free Radical Biology and Medicine 25: 576-585.
Nakano, Y. and Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant and Cell Physiology 22: 867-880.
Namdjoyan, S. and Kermanian, H. (2013) Exogenous nitric oxide (as sodium nitroprusside) ameliorates arsenic-induced oxidative stress in watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.) plants. Scientia Horticulturae 161: 350-356.
Neill, S., Desikan, R. and Hancock, J. T. (2003) Nitric oxide signaling in plants. New Phytologist 159: 11-35.
Praveen, A. and Gupta, M. (2018) Nitric oxide confronts arsenic stimulated oxidative stress and root architecture through distinct gene expression of auxin transporters, nutrient related genes and modulates biochemical responses in *Oryza sativa* L. Environmental Pollution 240: 950-962.
Rascio, N. and Navari-Izzo, F. (2011) Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? Plant Science 180: 169-181.
Rodriguez-Ruiz, M., Aparicio-Chacon, M. V., Palma, J. M. and Corpas, G. J. (2018) Arsenate disrupts ion balance, sulfur and nitric oxide metabolisms in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L.) plants. Environmental and Experimental Botany 161: 143-156.
Rohman, M. M., Hossain, M. D., Suzuki, T., Takada, G. and Fujita, M. (2009) Quercetin-4'-glucoside: a physiological inhibitor of the activities of dominant glutathione S-transferases in onion (*Allium cepa* L.) bulb. Acta Physiologiae Plantarum 31: 301-309.
Roy, and Saha, A. (2002) Metabolism and toxicity of arsenic: a human carcinogen. Current Science 82: 38-45.
Sahay, S. and Gupta, M. (2017) An update on nitric oxide and its benign role in plant responses under metal stress. Nitric Oxide 1,67: 39-52.
Sandalio, L. M., Rodriguez-Serrano, M., Gupta, D. K., Archilla, A., Romero-Puertas, M. C. and del Rio, L. A. (2012) Reactive oxygen species and nitric oxide in plants under cadmium stress: from toxicity to signaling. In: Environmental Adaptations and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climate Change (eds. Ahmad, P. and Prasad, M.) Springer, New York, NY.
Sarwar, N., Imran, M., Shaheen, M. R., Ishaque, W., Kamran, M. A., Matloob, A., Rehim, A. and Hussain, S. (2017) Phytoremediation strategies for soils contaminated with heavy metals: Modifications and future perspectives. Chemosphere 171: 710-721.
Sergiev, I., Alexieva, V. and Karanov, E. (1997) Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants. Comptes Rendus Academic Bulgare Science 51: 121-124.
Shahid, M., Pourrut, B., Dumat, C., Nadeem, M., Aslam, M. and Pinelli, E. (2014) Heavy-metal induced reactive oxygen species: phytotoxicity and physicochemical changes in plants. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology 232: 1-44.
Shaibur, M. R. and Kawai, S. H. (2010) Effect of arsenic on nutritional composition of japanese mustard spinach: An III effect of arsenic on nutritional quality of a green leafy vegetable. Scientific Reports – Nature 8: 186-194.
Shaibur, M. R., Kitajima, N., Sugawara, R., Kondo, T., Alam, Sh., Imamul-Huq, S. M. and Kawai, S. H. (2008) Critical toxicity level of arsenic and elemental composition of arsenic -Induced chlorosis in hydroponic sorghum. Water, Air, and Soil Pollution 191: 279-292.
Sharma, I. (2012) Arsenic induced oxidative stress in plants. Biologia 67: 447-453.
Shri, M., Kumar, S., Chakrabarty, D., Trivedi, P. K., Malick, S., Mishra, P., Shukla, D., Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R. D. and Tuli, R. (2009) Effect of arsenic on growth, oxidative stress, and antioxidant system in rice seedling. Ecotoxicology and Environmental Safety 72: 1102-1110.
Shukla, P., Singh, S., Dubey, P., Singh, A. and Singh, A. K. (2015) Nitric oxide mediated amelioration of arsenic toxicity which alters the alternative oxidase (Aox1) gene expression in *Hordeum vulgare* L. Ecotoxicology and Environmental Safety 120: 59-65.
Siddiqui, M. H., Al-Whaibi, M. H. and Basalah, M.O. (2011) Role of nitric oxide in tolerance of plants to abiotic stress. Protoplasma 248: 447-455.
Singh, A. P., Dixit, G., Kumar, A., Mishra, S., Singh, P. K., Dwivedi, S., Trivedi, P. K., Chakrabarty, D., Mallick, S., Pandey, V. and Dhankher, O. P. (2015) Nitric oxide alleviated arsenic toxicity by modulation of antioxidants and thiol metabolism in rice (*Oryza sativa* L.). Frontiers in Plant Science 6: 1272.
Singh, H. P., Batish, D. R., Kohali, R. K. and Arora, K. (2007) Arsenic induced root growth inhibition in mung bean (*Phaseolus aureus* Roxb.) is due to oxidative stress resulting from enhanced lipid peroxidation. Plant Growth Regulation 53: 65-73.
Singh, H. P., Kaur, S., Batish, D. R., Sharma, V. P., Sharma, N. and Kohli, R. K. (2009) Nitric oxide alleviates arsenic toxicity by reducing oxidative damage in the roots of *Oryza sativa* (rice). Nitric Oxide 20: 289-297.
Singh, N. and Ma, L. Q. (2006) Arsenic speciation, and arsenic and phosphate distribution in arsenic hyperaccumulator

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.41.3.3]

*Pteris vittata*L and non-hyperaccumulator *Pteris ensiformis* L. Environmental Pollution 141: 238-246.
Singh, V. P., Srivatava, P. K. and Prasad, S. M. (2013) Nitric oxide alleviates arsenic induced toxic effects in ridged Luffa seedlings. Plant Physiology and Biochemistry 71: 155-163.
Souri, Z. and Karimi, N. (2017) Enhanced phytoextraction by as hyperaccumulator *Isatis cappadocica* spiked with sodium nitroprusside. Soil and Sediment Contamination: An International Journal 26: 457-468.
Souri, Z., Karimi, N. and de Oliveira, L. M. (2018) Antioxidant enzymes responses in shoots of arsenic hyperaccumulator, *Isatis cappadocica* Desv., under interaction of arsenate and phosphate. Environmental Technology 39: 1316-1327.
Souri, Z., Karimi, N. and Sandalio, L. M. (2017) Arsenic hyperaccumulation strategies: an overview. Frontiers in Cell and Developmental Biology 5: 67.
Srivastava, M., Ma, L. Q., Singh, N. and Singh, S. (2005) Antioxidant responses of hyperaccumulator and sensitive fern species to arsenic. Journal of Experimental Botany 56: 1335-1342.
Stoeva, N., Berova, M., Vassilev, A. and Zlatev, Z. (2005) Effect of arsenic on some physiological parameters in bean plants. Biologia Plantarum 49: 293-296.
Talukdar, D. (2013) Arsenic-induced oxidative stress in the common bean legume, *Phaseolus vulgaris* L. seedlings and its amelioration by exogenous nitric oxide. Physiology and Molecular Biology of Plants 19: 69-79.
Tripathi, R. D., Srivastava, S., Mishra, S., Singh, N., Tuli, R., Gupta, D. K. and Maathuis, F. J. M. (2007) Arsenic hazards: Strategies for tolerance and remediation by plants. Trends in Biotechnology 25: 158-165.
Tripathi, R. D., Tripathi, P., Dwivedi, S., Dubey, S., Chatterjee, S., Chakrabarty, D. and Trivedi, P. K. (2012) Arsenomics: omics of arsenic metabolism in plants. Frontiers in Physiology 23: 3-275.
Tu, C. and Ma, L. Q. (2004) Comparison of arsenic and phosphate uptake and distribution in arsenic hyperaccumulating and non-hyperaccumulating fern. Journal of Plant Nutrition 27: 1227-1242.
Xu, J., Wang, W., Yin, H., Liu, X., Sun, H. and Mi, Q. (2010) Exogenous nitric oxide improves antioxidative capacity and reduces auxin degradation in roots of *Medicago truncatula* seedlings under cadmium stress. Plant and Soil 326: 321.
Ye, Z. H., Wong, M. H., Wang, H. B. and Liu, Y. (2009) The role of arsenate reductase and superoxide dismutase in As accumulation in four *Pteris* species. Environment International 35: 419-495.
Zhang, X. W., Zhang, M., Wang, Q. H., Qiu, X. K., Hu, G. Q. and Dong, Y. J. (2011) Effect of exogenous nitric oxide on physiological characteristic of peanut under iron-deficient stress. Plant Nutrition and Fertilizer Science 17: 665-673.
Zhu, S., Liu, M. and Zhou, J. (2006) Inhibition by nitric oxide of ethylene biosynthesis and lipoxygenase activity in peach fruit during storage. Postharvest Biology and Technology 42: 41-48.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.41.3.3]

The effect of arsenic and sodium nitroprusside on the physiological responses and antioxidant enzymes activity of *Isatis cappadocica*

Zahra Souri and Naser Karimi *

Department of Biology, Razi University, Kermanshah, Iran
(Received: 27/01/2019, Accepted: 02/08/2019)

Abstract

Arsenic (As) stress, through the creation of oxidative stress, can cause phytotoxicity (e.g. The decrease of growth and chlorophyll content) in plants. Nitric oxide (NO), by promotion of the antioxidant system, plays an important role in reducing heavy metal-induced oxidative stress. In this study, the role of exogenously applied sodium nitroprusside (SNP; a NO donor) on physiological responses and antioxidant enzyme effects of *Isatis cappadocica* were investigated on high levels of As. The results showed that, in the highest level of As, the oxidative damages increased and plant growth was reduced, while SNP alleviated these inhibitory effects. The maximum activity of antioxidant enzymes was observed at 1000 µM As treatment, in the presence of SNP. These results showed that the application of SNP, which is an activator of antioxidant enzymes, may play a compensatory role against As stress. In addition, the application of SNP increased the antioxidant capacity of *I. cappadocica* against stress conditions. On the other hand, the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD), ascorbate peroxidase (APX) and glutathione reductase (GR) were decreased at 1500 As treatment, which showed that Isatis possessed low potential to suppress oxidative stress. Unlike other antioxidant enzymes, glutathione S-transferase (GST) activity under1500 As treatment also increased. These results suggest that GST activity can play an important role in reducing the toxicity of high levels of As in *I. cappadocica*.

Key Words: *Isatis cappadocica*, Nitric oxide, Oxidative Stress, Phytotoxicity

Corresponding author, Email: nkarimi@razi.ac.ir

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.41.3.3]