

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)، گلوکاتایون 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 گلوکاتایون 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 (Emamveridian 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 (Emamveridian 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 مسؤول، نشانی پست الکترونیکی: nkarimi@razi.ac.ir

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 محدود هستند و از نظر فیزیولوژیکی، گیاهان منحصر به فردی محسوب می‌شوند، گیاهان بیش‌انباشتگر 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 بیش‌انباشتگر 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).

(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 et al., 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

یکی از اثرات سمیتی آرسنیک در گیاهان، افزایش میزان گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) است (Hartley-Whitaker et

پُر 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 پرو ساید تهیه شد و میزان مورد نیاز برای هر تیمار به محلول غذایی هوگلند اضافه گردید. در هر بار اضافه کردن هوگلند و انجام تیمار به منظور جبران مقدار آب تبخیر شده و عدم تجمع یون‌ها، آب زیر گلدانی‌ها با آب مقطر 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

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: بذره‌های گیاه *I. cappadocica* از منطقه معدنی آلوده به آرسنیک زرشوران، جایی که دامنه غلظت آرسنیک در خاک بین ۱۴۵ تا ۶۵۲۵ میلی‌گرم بر کیلو گرم گزارش شده است (Karimi et al., 2010)، جمع‌آوری گردید. ابتدا بذره‌های گیاه با سدیم هیپو کلرایت ۱٪ ضد عفونی و سپس با آب مقطر شستشو شدند. بذره‌های استریل‌شده در داخل گلدان‌هایی که از قبل با پرلیت و ماسه به نسبت ۲ به ۱

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 ذکر شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۳۹۰ نانومتر خوانده شد. در نهایت میزان H_2O_2 براساس قانون بیر لامبرت و با استفاده از ضریب خاموشی ($28 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) محاسبه و به صورت میکرومول بر گرم وزن تر بیان گردید.

مالون دی‌آلدهید (MDA): برای اندازه‌گیری میزان مالون دی‌آلدهید از روش Heath و Packer (۱۹۶۸) 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 طول موج ۵۳۲ نانومتر، خوانده شد. جذب بقیه رنگیزه‌های غیر اختصاصی در ۶۰۰ نانومتر تعیین و از مقدار حاصل کسر گردید. برای محاسبه میزان مالون دی‌آلدهید از ضریب خاموشی ($155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) و با استفاده از رابطه ۴ محاسبه شد.

رابطه ۴:

$$\text{MDA } (\mu\text{mol g}^{-1} \text{ FW}) = [\text{A}_{532} - \text{A}_{600}/155] \times 1000$$

استخراج عصاره پروتئین کل و آنزیمی: جهت استخراج

عصاره پروتئین و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، ۰/۱ گرم بافت برگ تازه در ۱ میلی‌لیتر بافر تریس-اسید کلریدریک (pH, ۷/۵) محتوی EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، DTT ۱ میلی‌مولار، آسکوربات ۱ میلی‌مولار، پلی‌وینیل‌پیرولیدین (PVP) ۰/۵٪ (وزنی-حجمی) و Tritone X-100 ۲٪ (حجمی-حجمی) هموژن شد.

میلی‌لیتر اسید نیتریک غلیظ مخلوط گردید. پس از نگهداری مخلوط حاصل به مدت ۲۴ 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 رقیق شده 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. در نهایت 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* و *b* و کلروفیل

کل از روش Arnon (۱۹۴۹) 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 ۴۰۰۰ دور و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. پس از آن جذب محلول رویی به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در طول‌موج‌های ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر ثبت گردید و در نهایت به منظور محاسبه کلروفیل *a* و *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:

$$\text{Chlorophyll } b \text{ (mg/g F.W)} = (22.9 \times A_{645} - 4.68 \times A_{663})$$

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 برگ با ۳ میلی‌لیتر تری‌کلرو استیک

دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۶۰ نانومتر خوانده شد. مقداری از آنزیم که بتواند تولید NBTDF را ۵۰ درصد بازدارد کند، معادل یک واحد آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در نظر گرفته می‌شود. فعالیت ویژه آنزیم براساس واحد در میلی گرم پروتئین بیان گردید.

آنزیم کاتالاز: برای اندازه‌گیری میزان غلظت کمی این آنزیم، ۵۰ میکرولیتر از عصاره استخراج‌شده را با ۱ میلی لیتر محلول اندازه‌گیری کاتالاز که حاوی بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار (pH, ۷) و آب اکسیژنه ۱۵ میلی مولار بود (Chance and Maehly, 1955)، مخلوط کرده و سپس جذب آن در طول موج ۲۴۰ نانومتر به مدت ۱ دقیقه، به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده گردید. میزان فعالیت ویژه آنزیم با در نظر گرفتن ضریب خاموشی ($39/4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) برحسب واحد بر میلی گرم 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 گویاکول توسط این آنزیم انجام شد. در این روش ۷۵ میکرولیتر از عصاره استخراج‌شده را با ۲/۵ میلی لیتر از محلول پراکسیداز که شامل ۱۳ میلی مولار گویاکول، آب اکسیژنه ۵ میلی مولار و بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار (pH=۷) بود، مخلوط کرده و به مدت ۱ دقیقه توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۷۰ نانومتر، جذب آن خوانده شد. میزان فعالیت ویژه آنزیم با در نظر گرفتن ضریب خاموشی ($26/6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) برحسب واحد بر میلی گرم پروتئین محاسبه گردید.

آنزیم آسکوربات پراکسیداز: اندازه‌گیری فعالیت آنزیم براساس تبدیل آسکوربات به منو دهیدرو 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 روش ۵۰ میکرولیتر از عصاره استخراج‌شده را با ۱ میلی لیتر محلول اندازه‌گیری آسکوربیک پراکسیداز که شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار (pH, ۷)، ۰/۱ میلی مولار EDTA، ۰/۵ میلی مولار اسید آسکوربیک و ۰/۱۵ میلی مولار

نمونه‌های هم‌ژن شده در ۱۲۰۰۰g و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. سپس فاز بالایی آن جهت خواندن میزان پروتئین و آنزیم‌های 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 (۱۹۷۶) استفاده شد. جهت تهیه معرف، مقدار ۰/۰۵ گرم کوماسی بریانت بلو G250 در ۵۰ میلی لیتر اتانول ۹۶ درصد در تاریکی به خوبی حل گردیده و سپس ۲۵ میلی لیتر اسید فسفریک ۸۵ درصد را قطره قطره به مخلوط فوق اضافه کرده و پس از هم‌زدن، حجم نهایی محلول با آب مقطر به حجم ۵۰۰ میلی لیتر رسید. برای اندازه‌گیری غلظت پروتئین هر نمونه، ۵۰ میکرولیتر عصاره استخراج‌شده به ۲/۵ میلی لیتر معرف کوماسی بلو تازه افزوده شد و سپس جذب نوری در طول موج 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 به دست 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 متوقف کردن 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 استخراج‌شده با ۲/۵ میلی لیتر محلول اندازه‌گیری سوپراکسید دیسموتاز که شامل ۰/۲ مولار بافر فسفات پتاسیم (pH, ۷/۵)، ۷۵ میکرو مولار NBT، ۱۳ میلی مولار ال-متیونین، ۰/۱ میلی مولار EDTA و ۲ میکرومولار ریبوفلاوین است، مخلوط گردید. جهت انجام واکنش، مخلوط مذکور به مدت ۱۰ دقیقه در زیر لامپ فلورسنت ۴۰ وات به فاصله ۳۵ سانتی‌متر قرار داده شد. با خاموش کردن لامپ واکنش متوقف و میزان جذب توسط

آب اکسیژنه بود، مخلوط کرده و سپس با اسپکتروفتومتر و در طول موج ۲۹۰ نانومتر، جذب آن خوانده شد. میزان فعالیت ویژه آنزیم با در نظر گرفتن ضریب خاموشی ($2/8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) برحسب واحد بر میلی گرم 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 میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم ۲۵ میلی مولار (pH, ۷)، ۱۵۰ میکرولیتر گلوتاتیون اکسید (GSSG) ۵ میلی مولار و ۱۵۰ میکرولیتر NADPH $1/2$ میلی مولار اضافه گردید و پس از اضافه کردن ۱۵۰ میکرولیتر عصاره استخراج شده، میزان فعالیت آنزیم در طول موج ۳۴۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر به مدت ۱ دقیقه خوانده شد. میزان فعالیت ویژه آنزیم با در نظر گرفتن ضریب خاموشی ($6/2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) برحسب واحد بر میلی گرم پروتئین محاسبه گردید.

آنزیم گلوتاتیون اس ترانسفراز: برای سنجش میزان فعالیت این آنزیم، کمپلکس واکنشی شامل ۹۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۱۰۰ میلی مولار (pH, ۷)، ۴۵۰ میکرولیتر گلوتاتیون احیا (GSH) ۱ میلی مولار، ۱۰۰ میکرولیتر ۱-کلرو، ۲ و ۴-دی نیتروبنزن (CDNB) ۱ میلی مولار و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیمی استخراج شده (Rohman et al., 2009)، تهیه گردید. سپس تغییرات جذب نمونه ها در طول موج ۳۴۰ نانومتر در مدت ۱ دقیقه ثبت شد. میزان فعالیت ویژه آنزیم با در نظر گرفتن ضریب خاموشی ($9/6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) برحسب واحد بر میلی گرم پروتئین محاسبه گردید.

آنالیز آماری: آزمایش در قالب فاکتوریل بر پایه طرح بلوک های کامل تصادفی، با سه تکرار طراحی و اجرا گردید. تجزیه و تحلیل داده های حاصل از این تحقیق با استفاده از نرم افزار آماری SPSS صورت گرفت. همچنین برای مقایسه میانگین ها، از آزمون دانکن استفاده گردید. نمودارها توسط نرم افزار Excel ترسیم شدند.

نتایج

اثر SNP و غلظت های مختلف آرسنیک بر پارامترهای رشد: نتایج تجزیه واریانس غلظت های مختلف آرسنیک (صفر، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میکرومولار) بر میزان وزن تر بخش هوایی در سطح ۰/۰۵ معنی دار بوده، درحالی که میزان وزن تر ریشه در سطح ۰/۰۵ معنی دار نمی باشد. حضور SNP در محیط رشد گیاه، باعث بهبود شاخص های مربوط به رشد گردید و اثر آن بر میزان وزن ریشه و وزن بخش هوایی در سطح ۰/۰۰۱ معنی دار است. اما اثر متقابل As و SNP بر پارامترهای رشد، در سطح ۰/۰۵ معنی دار نمی باشد (جدول ۱).

همان طور که در جدول ۲ ملاحظه می گردد، 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 غلظت های مختلف آرسنیک معنی دار نبود، اما حضور SNP منجر به افزایش معنی دار این شاخص در تیمارهای ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار گردید. همچنین این افزایش معنی دار در تیمارهای فاقد آرسنیک (شاهد) نیز مشاهده شد. میزان وزن تر بخش هوایی تحت اثر غلظت های مختلف آرسنیک، دارای روند نسبتاً کاهشی بوده، که در حضور SNP، این روند کاهشی به طور نسبی بهبود یافته است، به طوری که افزایش میزان وزن تر بخش هوایی در غلظت های 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 غلظت های مختلف آرسنیک بر محتوی کلروفیل: با توجه به جدول ۳، نتایج آنالیز واریانس نشان داد که تغییرات محتوی رنگیزه های فتوسنتزی (کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل) تحت تأثیر غلظت های مختلف آرسنیک در سطح ۰/۰۵ معنی دار نمی باشد. از سوی دیگر اثر SNP بر محتوی رنگیزه های فتوسنتزی در سطح ۰/۰۰۱

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

میانگین مربعات		درجه آزادی	منبع تغییرات
وزن بخش هوایی	وزن ریشه		
۰/۵۰۸ *	۰/۱۰۲ ^{ns}	۳	As
۲/۴۷ ***	۲/۷۷ ***	۱	SNP
۰/۰۰۴ ^{ns}	۰/۰۱۲ ^{ns}	۳	As × SNP
۰/۱۳۳	۰/۱۱۶	۱۶	خطا
		۲۳	کل

***، * و^{ns}، به ترتیب نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۰۱، ۰/۰۵ و عدم وجود 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	۱/۲۴ ± ۰/۲۲ ^b	۲/۰۳ ± ۰/۲۴ ^{abc}
۰	۲۰۰	۱/۸۶ ± ۰/۲۱ ^a	۲/۶۳ ± 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 ± ۰/۱۴ ^b	۱/۷۶ ± ۰/۱۴ ^{cd}
۱۰۰۰	۲۰۰	۱/۹۰ ± ۰/۲۵ ^a	۲/۳۶ ± ۰/۱۷ ^{abc}
۱۵۰۰	۰	۱/۰۰ ± ۰/۰۶۳ ^b	۱/۳ ± ۰/۲۰ ^{a-d}
۱۵۰۰	۲۰۰	۱/۶ ± ۰/۲۶ ^{ab}	۱/۹۶ ± ۰/۱۷ ^d

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

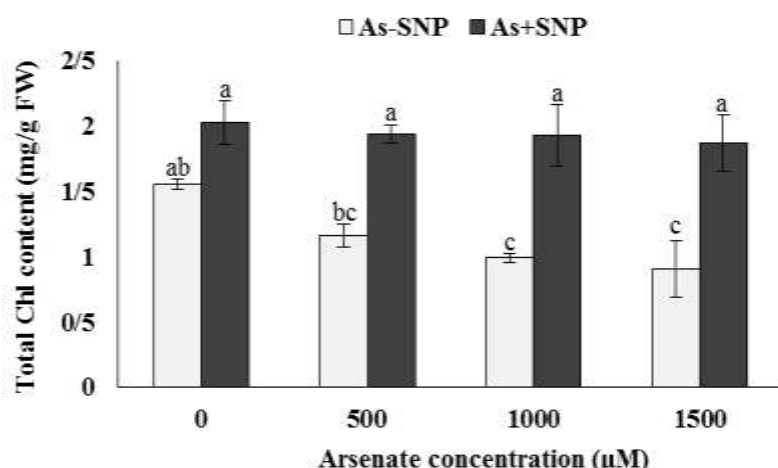
جدول ۳- جدول آنالیز واریانس اثر SNP و غلظت‌های مختلف As بر محتوی رنگیزه‌های فتوسنتزی (کلروفیل *a* و *b* و کل) گیاه

I. cappadocica

میانگین مربعات			درجه آزادی	منبع تغییرات
کلروفیل <i>a</i>	کلروفیل <i>b</i>	کلروفیل کل		
۱۷ ^{ns}	۰/۰۱ ^{ns}	۰/۱۷۵ ^{ns}	۳	As
۲/۶۳ ***	۰/۰۹۵ ***	۳/۷۲ ***	۱	SNP
۰/۰۳۱ ^{ns}	۰/۱۱ ^{ns}	۰/۰۷۸ ^{ns}	۳	As × SNP
۰/۴۹	۰/۰۰۴	۰/۰۷۲	۱۶	خطا
			۲۳	کل

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

معنی‌دار بوده درحالی‌که اثر متقابل As و SNP بر محتوی آن‌ها، با افزایش غلظت آرسنیک در محیط، محتوی کلروفیل کل در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار نیست. (کلروفیل *a* + کلروفیل *b*) کاهش یافت، هر چند که این روند



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.

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 میکرومولار، 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

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 ۴۹/۲ 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

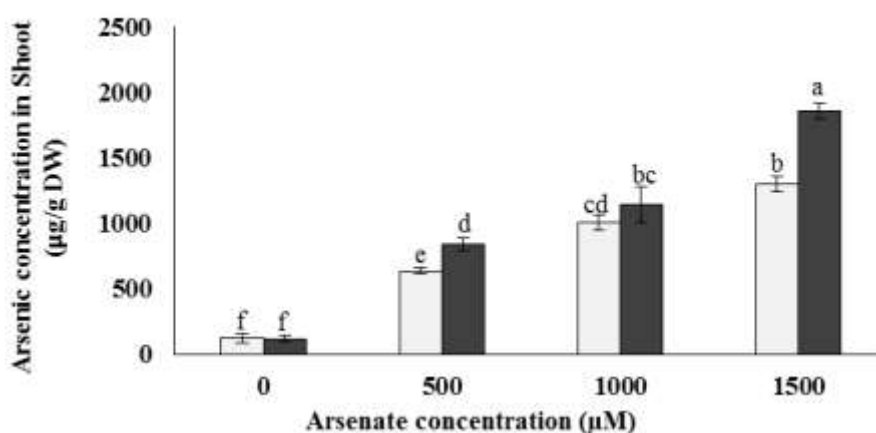
آرسنیک: با توجه به نتایج جدول آنالیز واریانس، میزان آرسنیک انباشت‌شده در بخش هوایی گیاه *I. cappadocica* تحت اثر غلظت‌های مختلف آرسنیک و همچنین حضور SNP در سطح ۰/۰۰۱ معنی‌دار است. اثر متقابل As و SNP بر میزان انباشت در بخش هوایی در سطح ۰/۰۱ معنی‌دار بود (جدول ۴).

با افزایش غلظت آرسنیک در تیمارهای مختلف، میزان انباشت آرسنیک در بخش هوایی روندی افزایشی داشت و

جدول ۴- 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	۲۲۴۸۳۸۷/۱ ***
SNP	۱	۲۹۶۴۹۷/۵ ***
As × SNP	۳	۸۵۰۱۱/۲ **
خطا	۱۶	۱۲۰۳۱/۶
کل	۲۳	

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



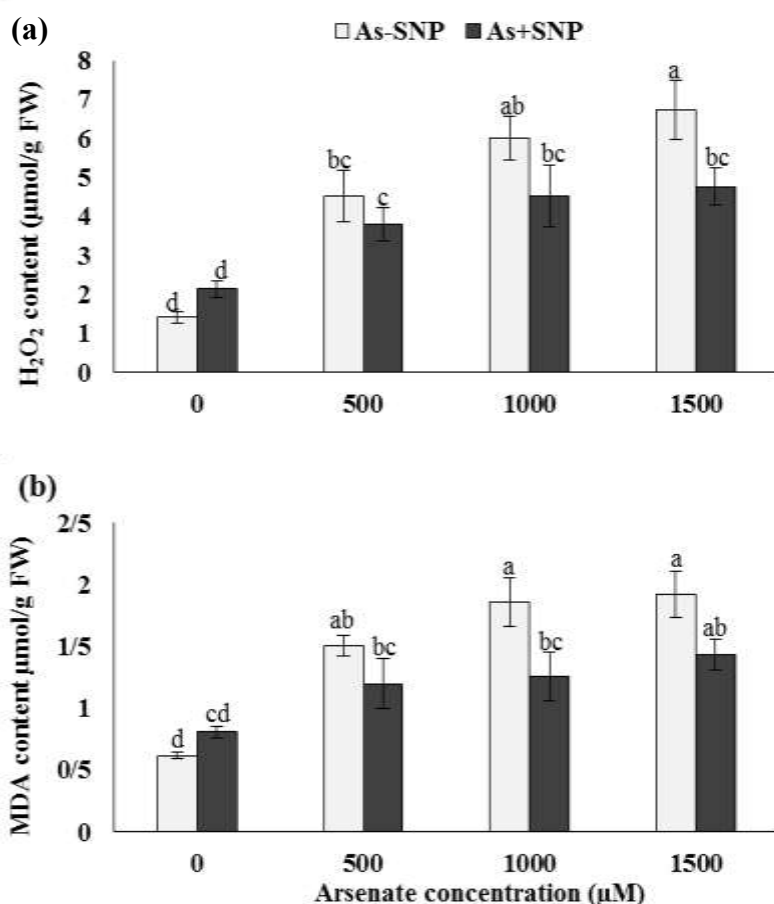
شکل ۲- تأثیر غلظت‌های مختلف آرسنیک و SNP بر انباشت آرسنیک در بخش هوایی گیاه *I. cappadocica*. حروف متفاوت بیانگر معنی‌دار بودن اثر تیمارها بر میانگین محتوی آرسنیک در بخش هوایی با استفاده از آزمون دانکن هستند.

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 MDA	H ₂ O ₂
As	۳	۱/۱ ***	۱۸/۸ ***
SNP	۱	۰/۵۳ *	۴/۴ *
As × SNP	۳	۰/۱۸ ns	۲/۰۷ ns
خطا	۱۶	۰/۰۶۷	۰/۸۹
کل	۲۳		

***، *، 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 ۴/۸ و ۱۵۰۰ و ۱۰۰۰ در تیمارهای ۱۵۰۰ و ۳/۱ برابر نمونه شاهد بود. به واسطه حضور SNP، محتوی میکرومولار به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. کاهش محتوی



شکل ۳- تأثیر غلظت‌های مختلف آرسنیک و SNP بر محتوی پراکسید هیدروژن (H₂O₂) (a) و مالون دی‌آلدهید (MDA) (b) در بخش هوایی گیاه *I. cappadocica*. حروف متفاوت بیانگر معنی‌دار بودن اثر تیمارها بر میانگین محتوی H₂O₂ و MDA با استفاده از آزمون دانکن هستند.

جدول ۶- 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*

میانگین مربعات						درجه آزادی	منبع تغییرات
SOD	CAT	POD	APX	GR	GST		
۲۷۴۹/۸ ***	۱۴۲۸۶/۶ ***	۴۹۲/۸ ***	۲۰۵۷۰۳۴۹/۹ ***	۱۸۸۴۱۰۹/۸ ***	۸۴۶۱۸/۴ ***	۳	As
۱۱۵۸/۴ *	۱۳۷۴۸/۴ ***	۲۳۷/۱ *	۵۵۸۱۵۶۷/۵ **	۱۱۷۶۴۰۱/۵ **	۱۱۴۵۲/۸ **	۱	SNP
۹۲/۶ ns	۲۰۲۶/۹ **	۱۲/۴ ns	۵۷۱۷۱۸/۳ ns	۱۴۴۴۹۷/۵ ns	۱۱۲۸/۹ ns	۳	As × SNP
۱۳۴/۳	۲۵۴/۹	۲۰/۹	۶۱۴۶۲۰/۷	۱۰۷۲۲۵/۷	۱۰۶۰/۱	۱۶	خطا
						۲۳	کل

***، **، * 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.

H₂O₂ 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.

اثر SNP و غلظت‌های مختلف آرسنیک بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان: با توجه به جدول ۶، 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 GR، APX و GST در 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.

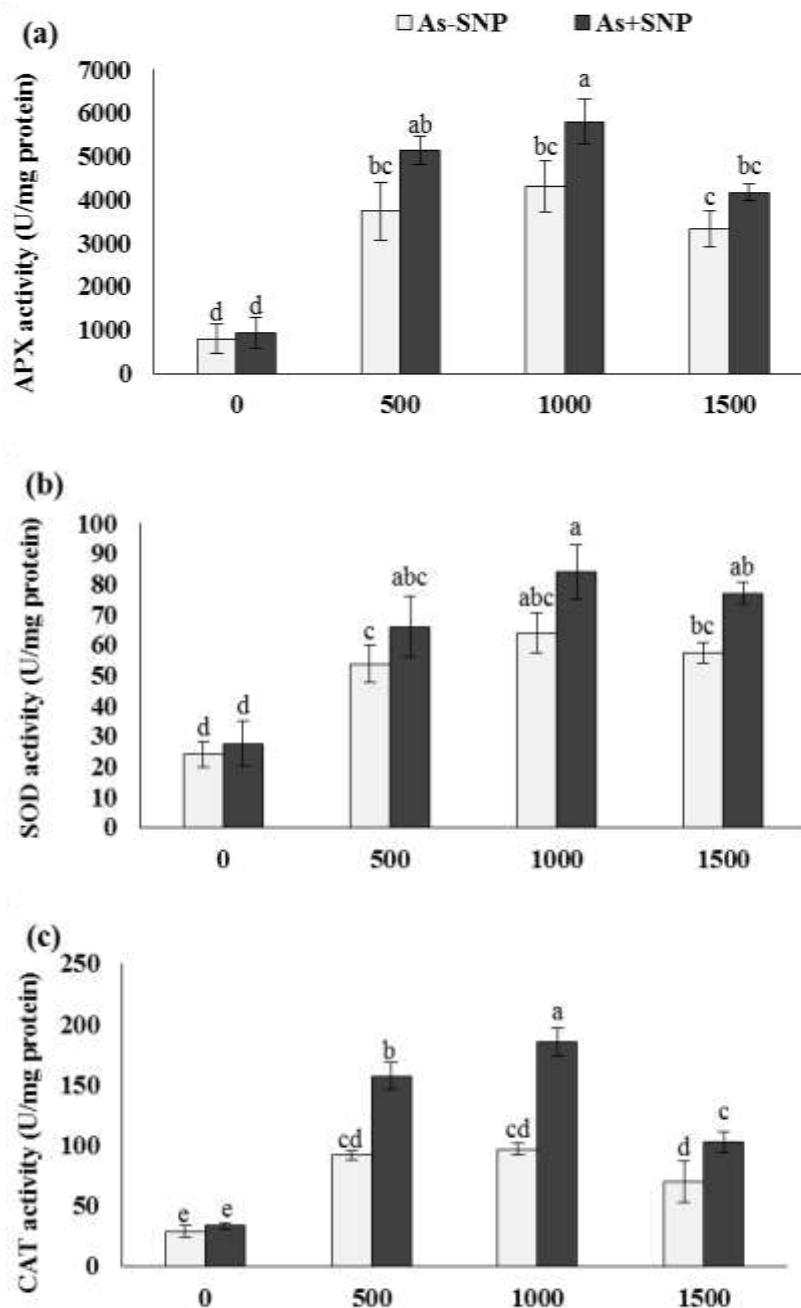
با توجه به شکل ۴، به موازات افزایش سطوح آرسنیک در محیط میزان فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT، POD، APX، GR و GST روند افزایشی داشته است. این روند افزایشی در تیمار ۱۰۰۰ میکرومولار محسوس بود، به نحوی که میزان فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT، POD، APX و GR به ترتیب ۲/۶، ۳/۴، ۳/۵، ۵/۴ و ۲/۳ برابر نسبت به نمونه شاهد 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 ۶/۸ 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 میکرومولار 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، ۳۴/۵ و ۴۸/۳ درصد بود (شکل ۴).

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* (Jung et al., 2017) و *Lupinus* (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, 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).

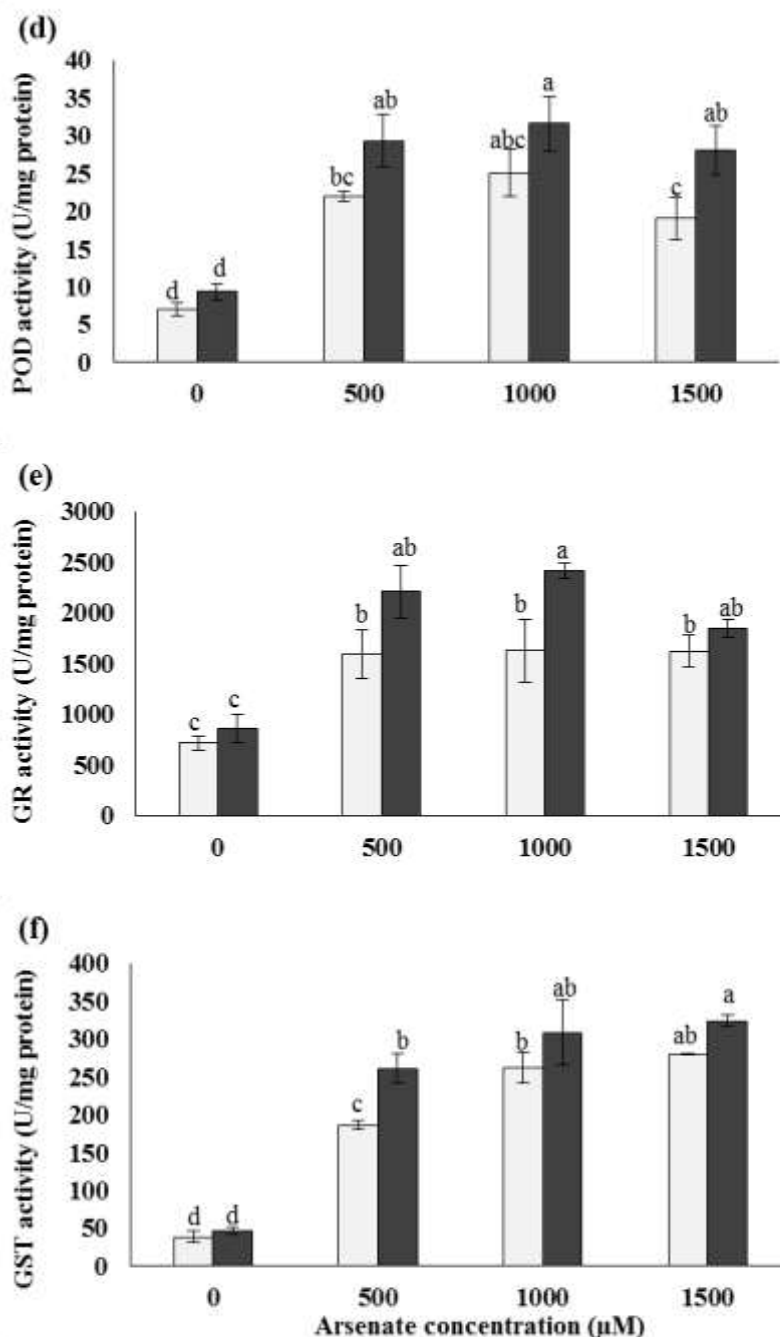
بر طبق نتایج به‌دست آمده از این پژوهش، کاربرد خارجی



شکل ۴- 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.

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

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



ادامه شکل ۴- تأثیر غلظت‌های مختلف آرسنیک و اثر SNP بر فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز (POD) (d)، گلوکاتایون ردوکتاز (GR) (e) و گلوکاتایون 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.

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،

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.

مختل شدن پروسه زنجیره انتقال الکترون و اختلال در عملکرد فتوسنتسم‌ها 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 مواجهه 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، ۱۳۹۴). 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 et al., 2015; 2016; Souri et al., 2017; Souri et al.,

2018). همان‌طور که 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 et al., 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 کارایی فرایند انتقال از ریشه به بخش هوایی، باشد. به‌طور کلی 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 آنجایی که مکانیسم‌های

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 فتون که در طی آن رادیکال‌های آزادی مانند H_2O_2 تولید می‌شود، از گیاه در برابر تنش اکسیداتیو محافظت می‌کند (Hsu and Kao, 2017; Sahay and Gupta, 2004). 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 آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نشان دادند که با افزایش سطوح آرسنیک محیط، میزان فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT، POD، APX، GR و GST در گیاه *I. cappadocica* افزایش یافت، در حالی که 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 این رو از آنزیم SOD به عنوان اولین خط دفاعی در برابر تنش اکسیداتیو نام برده می‌شود (Karimi and Sour, 2016). به نظر می‌رسد فعالیت بالای آنزیم SOD در تیمار ۱۰۰۰

مقاومت و سمیت‌زدایی در گیاهان بیش‌انباشتگر با سایر گیاهان متفاوت است و یکی از مهم‌ترین استراتژی‌های کاربردی در این گیاهان سنتز لیگاندهایی با وزن مولکولی پایین نظیر گلوکاتایون و فیتوکلاتین‌ها است (Karimi et al., 2009)، به نظر می‌رسد که NO آزاد شده از SNP، از طریق فعال کردن 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 بیش‌انباشتگر 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 پراکسیداسیون 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; Sour, 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.

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 از 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 بیوستنز 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 بیوستنز ترکیبات فنلی نظیر لیگنین در گیاه *I. cappadocica* باشد. آنزیم‌های APX و GR از آنزیم‌های مهم چرخه گلوکاتایون-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 گلوکاتایون-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; Kisa, 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; Kisa, 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 و GST و همچنین تجمع ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، 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 کلسمی و ناقل‌های مربوطه، در

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 کارایی سیستم آنتی‌اکسیدانی در تیمارهای مورد مطالعه، مشاهده گردید و NO با اثرات چند جانبه خود، نقش مهمی در کاهش اثرات منفی تنش داشت.

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 (Shukla et al., 2013) و جو (Hasanuzzaman and Fujita, 2013) 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

منابع

- کریمی، ن. و سوری، ز. (۱۳۹۴) بررسی اثر متقابل آرسنیک و فسفر بر محتوی کلروفیل و میزان تجمع مالون دی‌آلدهید در گیاه *I. cappadocica* مجله فرآیند و کارکرد گیاهی ۴: 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., Roccoliello, 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.

- 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 (*Prosopis* sp.): 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*,

- 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

- Pteris vittata* L. and non-hyperaccumulator *Pteris ensiformis* L. Environmental Pollution 141: 238-246.
- Singh, V. P., Srivastava, 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.

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 μ M 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 under 1500 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