

بررسی اثر متقابل آرسنیک و فسفر بر محتوی کلروفیل و میزان تجمع مالون دی آلدهید در گیاه *Isatis cappadocica*

ناصر کریمی* و زهرا سوری

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی کرمانشاه

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۹/۲۳، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۳/۰۲/۲۱)

چکیده:

آرسنیک یکی از مهمترین ترکیبات آلوده کننده محیط زیست محسوب می‌شود. آرسنیک از طرق مختلف از جمله تشکیل گونه‌های اکسیژن فعال و در نتیجه پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی باعث اختلال رشد گیاهان می‌شود. فسفر به دلیل تشابه خواص فیزیکی و شیمیایی با آرسنیک می‌تواند بر عملکرد آن در گیاهان اثر بگذارد. در این مطالعه اثر متقابل آرسنیک و فسفر در شرایط آبکشت بر گیاه *Isatis cappadocica* که اخیراً به عنوان گیاه بیش انباشتگر آرسنیک شناخته شده است، بررسی شد. بدین منظور غلظت‌های مختلف آرسنیک (۰، ۵۰، ۲۰۰، ۸۰۰ و ۱۲۰۰ میکرومولار) و فسفر (۰، ۵۰، ۲۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میکرومولار)، در مرحله ۴ برگی بر گیاه اثر داده و محتوی کلروفیل، پراکسید هیدروژن، مالون دی‌آلدهید، آرسنیک، فسفر و زیست توده بخش هوایی اندازه‌گیری شد. بیشترین غلظت آرسنیک در تیمار ۱۲۰۰ میکرومولار آرسنیک و ۵ میکرومولار فسفر مشاهده گردید. افزایش سطوح بالای فسفر در محیط، باعث کاهش میزان تجمع آرسنیک گردید، که تأیید کننده وجود اثر متقابل بین این دو عنصر در گیاه می‌باشد. به دنبال افزایش سطوح آرسنیک در هر تیمار تجمع پراکسید هیدروژن به طور معنی داری افزایش یافت و منجر به پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی گردید که افزایش محتوی مالون دی‌آلدهید این مطلب را تأیید نمود. عدم کاهش معنی دار میزان زیست توده و کلروفیل، نشان دهنده مقاومت بالای گیاه *Isatis cappadocica* نسبت به آرسنیک می‌باشد.

کلمات کلیدی: آرسنیک، بیش انباشت، زیست توده، فسفر، کلروفیل، مالون دی‌آلدهید، *Isatis cappadocica*

مقدمه:

گیاهان و جانوران را داشته و به وسیله‌ی زنجیره‌ی غذایی به انسان منتقل می‌شود (Roy and Saha, 2002). این عنصر سمی در صورتیکه از طریق خاک به بخش‌هایی از گیاه که مورد استفاده انسان و دام است در غلظت بیش از ۱۰ میکروگرم بر گرم منتقل شود، باعث ایجاد سمیت می‌گردد. اگرچه آلودگی آرسنیک بیشتر متعلق به کشورهای جنوب شرقی آسیا می‌باشد ولی در مناطقی از ایران (استان‌های کردستان و خراسان) نیز آلودگی خاک و آب به این آلاینده گزارش شده است (Karimi et al., 2010). آرسنیک و فسفر هردو متعلق به گروه

آرسنیک یک شبه فلز سمی و غیر ضروری برای گیاهان است که از طریق منابع طبیعی (فعالیت‌های زمین شناسی، آتشفشان-ها) و منابع مصنوعی (استفاده از حشره‌کش‌ها، علف‌کش‌ها، و غیره) محیط زیست را آلوده می‌کند (Gunes et al., 2009). انسان از طریق فعالیت‌های معدن کاری در مناطق آلوده و مصرف آب آشامیدنی و مواد غذایی آلوده به آرسنیک در معرض این سم خطرناک قرار می‌گیرد (Zhao et al., 2009). آرسنیک یکی از سموم مهم محیطی است که توانایی تجمع در

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

(Dubey, 2006) و القای تنش اکسیداتیو شود (Singh et al., 2007). گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) با پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء و در نتیجه بالا رفتن سطوح مالون دی‌آلدهید، باعث کاهش زیست توده گیاه و در نهایت می‌توانند منجر به مرگ سلول شوند (Gunes et al., 2009). امروزه در فرایند گیاه پالایی (Phytoremediation)، گیاهان بیش انباشتگری که می‌توانند مقدار زیادی از آلاینده را در اندام هوایی خود انباشت کنند، بسیار مورد توجه قرار گرفته اند.

گیاه *I. cappadocica* به عنوان اولین بیش انباشتگر آرسنیک در گیاهان نهان دانه است که می‌تواند غلظت بالای از آرسنیک را در اندام های هوایی خود انباشت کند (Karimi et al., 2009, 2010, 2013). این گیاه بومی ایران است و می‌تواند به عنوان یک گیاه بیش انباشتگر آرسینک در فرایند گیاه پالایی مناطق آلوده کشور مورد استفاده قرار گیرد. در این پژوهش، تغییر میزان کلروفیل، پراکسید هیدروژن، مالون دی‌آلدهید و زیست توده بخش هوایی به منظور بررسی میزان مقاومت گیاه *I. cappadocica* در شرایطی که اثر متقابل فسفر و آرسنیک بر این گیاه اثر داده شد، مقایسه گردید.

مواد و روش‌ها:

کشت گلدانی: بذره‌های گیاه *Isatis cappadocica* از منطقه‌ی معدنی آلوده به آرسنیک زرشوران واقع در استان آذربایجان غربی، جمع آوری گردید. ابتدا بذره‌های گیاه با سدیم هیپو کلرایت ۱٪ ضد عفونی و سپس با آب مقطر شستشو شدند. بذره‌های استریل شده در داخل گلدان‌هایی که از قبل با پرلیت و ماسه به نسبت ۲ به ۱ پر شده، قرار گرفت، سپس گلدان‌ها به گلخانه‌ی دانشگاه رازی کرمانشاه، با شرایط محیطی نیمه کنترل شده شامل دمای متناوب ۱۸-۲۵ درجه‌ی سانتی گراد (شب و روز)، رطوبت نسبی ۴۵ درصد، تناوب نوری ۱۶ ساعت نوری و ۸ ساعت تاریکی و شدت نوری حدود ۱۵۰ میکرو مول فوتون در متر مربع، انتقال داده شدند. پس از جوانه زنی، گلدان‌ها هر هفته با محلول غذایی تغییر یافته هوگلند، تغذیه شدند که ترکیب آن عبارت بود از: ۰/۵ میلی‌مولار KNO_3 .

پانزده جدول تناوبی عناصر شیمیایی هستند که به دلیل خصوصیات شیمیایی مشابه، رفتار مشابهی در خاک و گیاهان دارند (Lihong and Guilan, 2009). آرسنات به عنوان آنالوگ فسفات به وسیله سیستم انتقال دهنده فسفات در گیاه، جذب می‌شود (Meharg and Macnair., 1992). مطالعات مختلف نشان داده است که حضور فسفات در مراحل رشد گیاه، اثرات زیادی بر جذب و تجمع آرسنیک دارد (مهدیه و همکاران، ۱۳۹۱; Tu and Ma, 2003). برخلاف آرسنیک، فسفر جزء عناصر ضروری مورد نیاز گیاه به شمار می‌آید و معمولاً نقش محدودکننده‌ای در رشد و نمو گیاه دارد. آرسنیک می‌تواند در واکنش‌های آنزیمی به جای فسفر وارد شود، که این موضوع باعث اختلال در فرایندهای زیستی درون سلولی می‌گردد. فسفر جزئی از ساختمان ماکرومولکول‌های حیاتی نظیر قندهای فسفات، اسیدهای نوکلئیک، نوکلئوتیدها و فسفولیپیدها می‌باشد. فسفر در برابر سمیت آرسنیک نقش مهمی را ایفا می‌کند و بر این اساس مقدار مولی آرسنیک/ فسفر در بافت‌های گیاهی می‌تواند به عنوان یک فاکتور مؤثر بر رشد گیاه تعریف شود. بررسی دقیق اثر متقابل فسفر و آرسنیک بر جذب و انتقال آنها در گیاهان می‌تواند اطلاعات مفیدی را در مورد نحوه‌ی سازگاری و مقاومت گیاهان به غلظت‌های مختلف آرسنیک فراهم کند.

فلزات سنگین یا به طور مستقیم از طریق واکنش هابر-ویز و یا به طور غیر مستقیم باعث تولید انواع گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) و در نتیجه ایجاد تنش اکسیداتیو در گیاهان می‌شوند (Mithofer et al., 2004). شواهد نشان می‌دهند که فعالیت انواع (ROS)، سبب بروز خسارات زیادی از جمله پراکسیداسیون لیپیدها، اکسید شدن پروتئین‌ها، بی‌رنگ شدن کلروپلاست‌ها و رنگدانه‌ها می‌گردند (Herbinger et al., 2002; Mittler., 2002). آرسنیک با افزایش تحریک واکنش‌های تولید گونه‌های فعال اکسیژن و تولید رادیکال‌های آزاد، به ویژه در غشای کلروپلاست‌ها منجر به ایجاد تنش اکسیداتیو می‌گردد (Morel, 2008). آرسنیک می‌تواند در غلظت‌های بالا با گروه‌های تیولی پروتئین‌ها واکنش داده و باعث کاهش فعالیت آنزیم‌ها (Jain and Gadre, 2004; Mishra and

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

اندازه گیری غلظت فسفر: برای سنجش فسفر از روش خاکستر خشک استفاده گردید. بدین منظور به ۰/۵ گرم ماده‌ی خشک گیاهی ۲ میلی لیتر اسید نیتریک (۱:۲) اضافه کرده و پس از صاف کردن آن با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسید. از محلول فوق، ۲۵ میلی لیتر برداشته و به بالن ژوژه‌ی ۵۰ میلی لیتری انتقال داده شد. با توجه به pH اسیدی نامشخص محلول، با اضافه نمودن آمونیاک (۱:۱)، pH را به ۷/۸ رساندیم. پس از خنثی شدن محلول با اضافه کردن اسید نیتریک (۱:۲)، pH را در محدوده‌ی ۲-۱/۵ تنظیم کرده و سپس با اضافه کردن ۱۵ میلی لیتر معرف آمونیوم وانادات، بعد از تشکیل کمپلکس زرد رنگ، حجم محلول را با آب مقطر به ۵۰ میلی لیتر رسانده شد. سپس مقدار جذب هر محلول توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Bausch and Lomb 70، در طول موج ۴۵۰ نانومتر ثبت گردید. با کمک منحنی حاصل از مقدار جذب محلول‌های استاندارد (دی هیدروژن فسفات پتاسیم)، غلظت فسفر در نمونه‌های گیاهی مورد سنجش قرار گرفت.

اندازه گیری محتوی پراکسید هیدروژن (H₂O₂): برای

۰/۷۵ میلی‌مولار Ca(NO₃)₂، ۰/۲ میلی‌مولار MgSO₄، ۱۵ میکرومولار H₃BO₃، ۲ میکرومولار MnCl₂، ۱ میکرومولار ZnSO₄، ۰/۵ میکرومولار CuSO₄، ۵۰ میکرومولار FeEDTA، ۰/۲ میکرومولار NaMoO₄. پس از رسیدن به مرحله‌ی ۴ برگ، گلدان‌ها به گروه‌های ۳ گلدانی (هر تیمار، ۳ تکرار) تقسیم شدند و برای مدت ۴ هفته، هر هفته ۲ بار به آن‌ها تیمار های ۰، ۵۰، ۲۰۰، ۸۰۰ و ۱۲۰۰ میکرو مولار آرسنات (Na₂HAsO₄) و ۰، ۵، ۲۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میکرو مولار فسفات (KH₂PO₄) اضافه گردید. با توجه به مطالعات آزمایشگاهی که قبلاً بر روی گیاهان مختلف تحت استرس آرسنیک انجام داده بودند و مطالعات کریمی و همکاران (۲۰۱۰) که غلظت آرسنیک را در نقاط مختلف خاک منطقه آلوده زرشوران اندازه گرفته بودند، این غلظت‌ها انتخاب شد. بعد از اتمام زمان تیمار، گیاهان از درون گلدان‌ها بیرون آورده شد و بخش هوایی آن‌ها جدا و به منظور انجام مراحل بعدی، جمع آوری گردید.

اندازه گیری محتوی کلروفیل: برای تعیین میزان کلروفیل a، b و کلروفیل کل از روش آرنون (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 تدریجی و تا حصول یک محلول سبز رنگ ادامه یافت. سپس حجم محلول با استن به ۲۰ میلی لیتر رسید. محلول حاضر به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور و در دمای ۴ درجه‌ی سانتی گراد سانتریفیوژ گردید. پس از آن جذب محلول رویی به وسیله‌ی دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر ثبت گردید و در نهایت به منظور محاسبه‌ی کلروفیل a، b و کلروفیل کل از فرمول زیر استفاده شد:

$$\text{کلروفیل a} = [(12.7 \times \text{جذب نانومتر}) - (2.6 \times 645)]$$

$$\text{کلروفیل b} = [(22.9 \times \text{جذب نانومتر}) - (4.68 \times 663)]$$

جذب نانومتر) [میلی لیتر استون / میلی گرم بافت برگ

جذب نانومتر) [میلی لیتر استون / میلی گرم بافت برگ

کلروفیل کل = کلروفیل a + کلروفیل b

گردید. نمودارها توسط نرم افزار Excel ترسیم شدند.

نتایج:

اثر غلظت‌های مختلف آرسنیک و فسفر بر میزان زیست توده: میزان زیست توده بخش هوایی در غلظت‌های مختلف آرسنیک (به جز تیمار ۱۲۰۰ میکرومولار) روند کاهشی محسوسی ندارد که این امر بیانگر مقاومت بالای گیاه در مقابله با تنش آرسنیک است. بیشترین میزان زیست توده در مقایسه با سایر تیمارها، مربوط به تیمار ۵۰ میکرومولار آرسنیک و ۱۶۰۰ میکرومولار فسفر می‌باشد. در تیمار ۱۲۰۰ میکرومولار آرسنیک و ۵ میکرومولار فسفر، کاهش محسوسی در میزان زیست توده مشاهده شد به طوری که با سایر تیمارها اختلاف معنی داری دارد. از طرف دیگر با افزایش غلظت فسفر، روند افزایشی در میزان زیست توده مشاهده گردید (شکل ۱).

غلظت آرسنیک، تحت اثر غلظت‌های مختلف آرسنیک و

فسفر: با اعمال تیمارها، غلظت آرسنیک بین حداقل ۲/۰۹۶۵ (تیمار ۰ میکرومولار آرسنیک، ۵۰ میکرومولار فسفر) و حداکثر ۷۰۰/۹۳۷ میلی گرم در کیلوگرم وزن خشک (تیمار ۱۲۰۰ میکرومولار آرسنیک و ۵ میکرومولار فسفر) متغیر بوده است. غلظت آرسنیک در تیمارهای ۱۲۰۰ میکرومولار آرسنیک، افزایش معنی داری نسبت به سایر تیمارها داشت (شکل ۲). در سطوح پایین فسفر (۵ و ۵۰ میکرومولار) غلظت آرسنیک نسبت به سایر تیمارها بیشتر بود ولی به دنبال افزایش سطوح فسفر، غلظت آرسنیک کاهش یافت که این امر می‌تواند به دلیل افزایش رقابت و اثر متقابل بین این دو عنصر باشد.

غلظت فسفر، تحت اثر غلظت‌های مختلف آرسنیک و

فسفر: میزان فسفر تجمع یافته در بخش هوایی گیاه بین حداقل ۱۶/۶۲ (تیمار ۱۲۰۰ میکرومولار آرسنیک، ۵ میکرومولار فسفر) و حداکثر ۱۲۳/۳۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن خشک (تیمار صفر میکرومولار آرسنیک، ۱۶۰۰ میکرومولار فسفر) متغیر بوده است. با افزایش غلظت آرسنیک ($\mu M \leq 200$)، میزان جذب و تجمع فسفر روند کاهشی یافت. از سوی دیگر

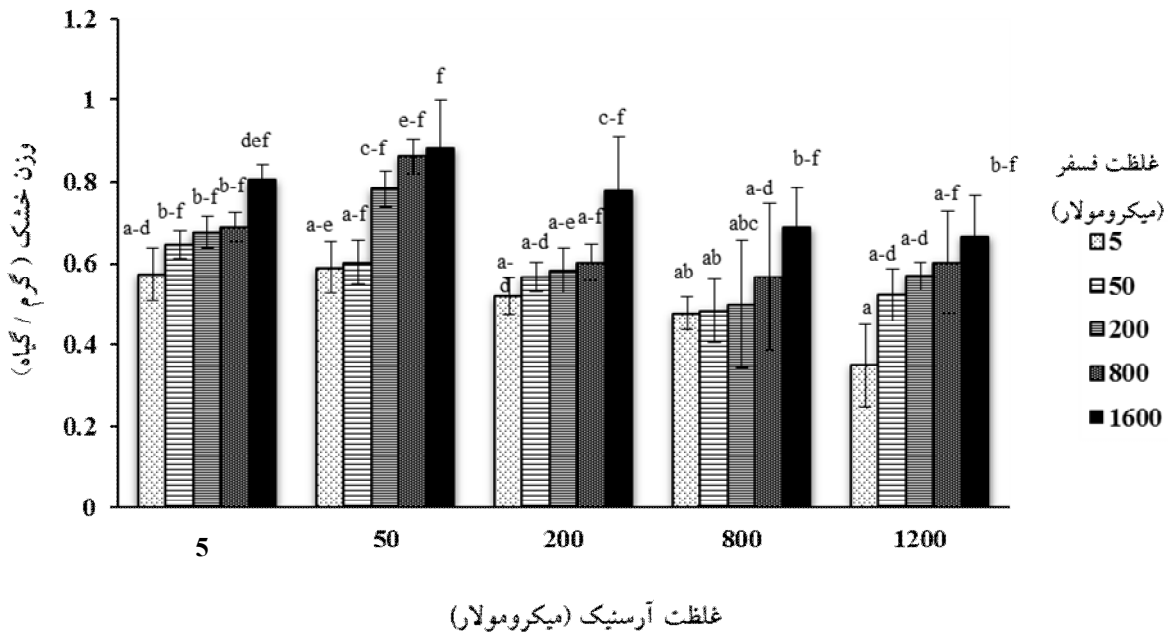
تعیین محتوی پراکسید هیدروژن، از روش Sergiev و همکاران (۱۹۹۷) با اندکی تغییر استفاده شد. ۰/۲ گرم از بافت برگ با ۳ میلی‌لیتر تری کلرو استیک اسید ۰/۱ درصد در هاون چینی ساییده شد و عصاره‌ی حاصل در ۱۲۰۰۰ دور، به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از مایع رویی برداشته و به ۰/۵ میلی‌لیتر بافر 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 قرائت شد و در نهایت میزان H_2O_2 به صورت میکرومول بر گرم وزن تر بیان گردید. (ضریب خاموشی: $28 Mm^{-1} cm^{-1}$)

اندازه گیری محتوی مالون دی آلدئید (MDA):

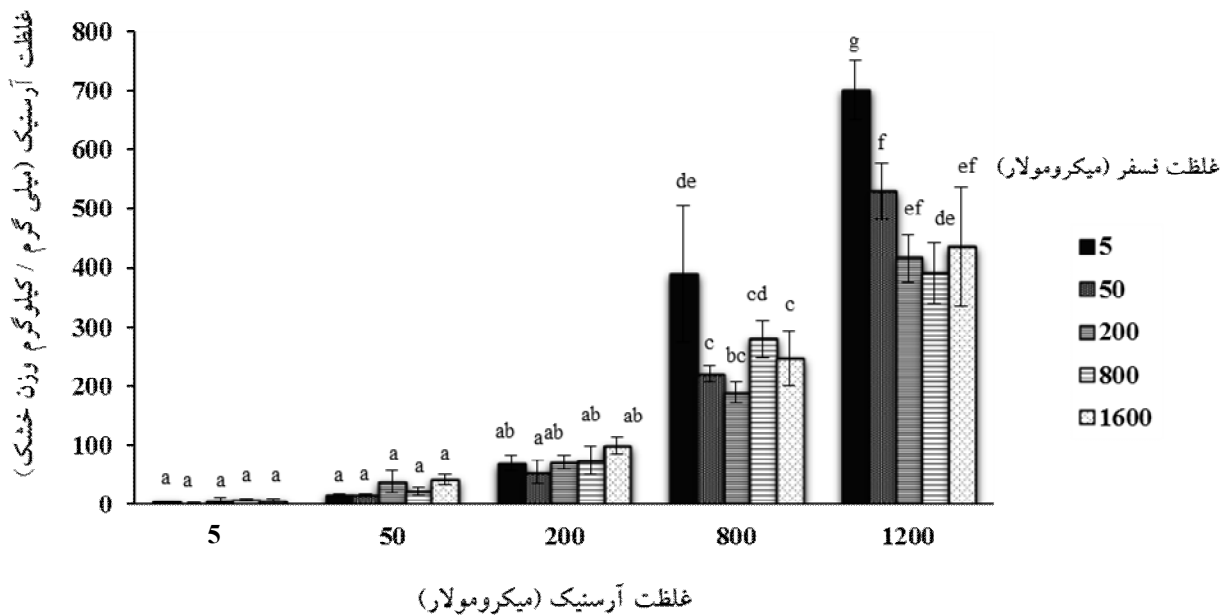
اندازه گیری میزان مالون دی آلدئید از روش هیس و پکر استفاده شد. طبق این روش ۰/۱ گرم برگ تازه در هاون چینی، حاوی ۵۰۰ میلی لیتر تری کلرو استیک اسید (TCA) ۰/۱ درصد سائیده شد. عصاره‌ی حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰۰، سانتریفیوژ گردید. در مرحله بعد ۲۵۰ میکرولیتر از محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ با ۷۵۰ میکرولیتر محلول مالون دی آلدئید که حاوی تری کلرو استیک اسید (TCA) ۲۰ درصد و تیو باربیتوریک اسید (TBA) ۰/۵ درصد است، مخلوط گردید. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی گراد در بن ماری 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 محاسبه‌ی محتوی MDA، از ضریب خاموشی معادل $155 Mm^{-1} Cm^{-1}$ استفاده شد).

آنالیز آماری داده‌ها:

آنالیز آماری داده‌ها: آزمایش در قالب فاکتوریل بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی، با سه تکرار اجرا گردید، تیمارها شامل تنش آرسنیک (در ۵ سطح) و غلظت‌های مختلف فسفر (در ۵ سطح) بودند. تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از مراحل مختلف این تحقیق با استفاده از نرم افزار آماری SPSS صورت گرفت. همچنین برای مقایسه‌ی میانگین‌ها، از آزمون دانکن استفاده



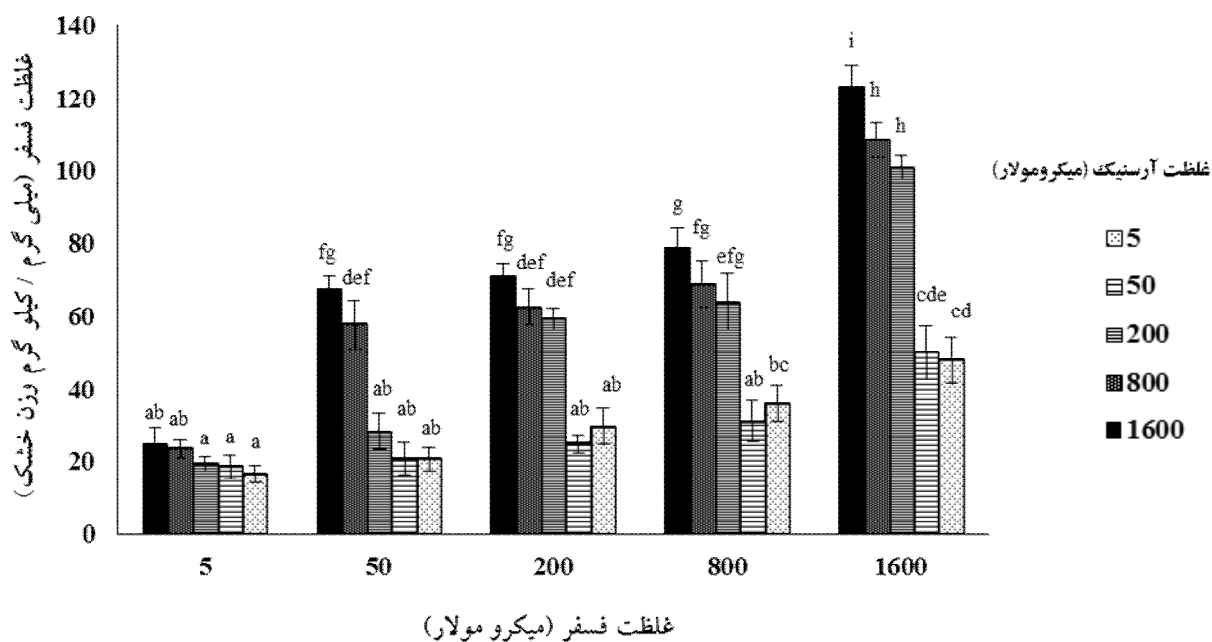
شکل ۱- اثر غلظت‌های مختلف آرسنیک و فسفر بر میزان زیست توده گیاه *I. cappadocica* حروف مشابه در هر ستون بیانگر معنی دار نبودن اثر تیمارها بر میانگین زیست توده بخش هوایی، با استفاده از آزمون دانکن می‌باشد. مقادیر میانگین سه تکرار، \pm SE است.



شکل ۲- اثر غلظت‌های مختلف آرسنیک و فسفر بر غلظت آرسنیک گیاه *I. cappadocica* حروف متفاوت هر ستون بیانگر معنی دار بودن اثر تیمارها بر میانگین غلظت آرسنیک در بخش هوایی گیاه، با استفاده از آزمون دانکن می‌باشد. مقادیر میانگین سه تکرار، \pm SE است.

میکرومولار آرسنیک با شدت بیشتری صورت گرفت به نحوی که با سایر تیمارها اختلاف معنی داری دارند (شکل ۳).
اثر غلظت‌های مختلف آرسنیک و فسفر بر محتوی

در سطوح بالای فسفر ($\leq 50 \mu\text{M}$) به موازات افزایش غلظت آرسنیک در هر تیمار، میزان تجمع فسفر به طور محسوسی کاهش پیدا کرده است. این کاهش در غلظت‌های ۸۰۰ و ۱۲۰۰



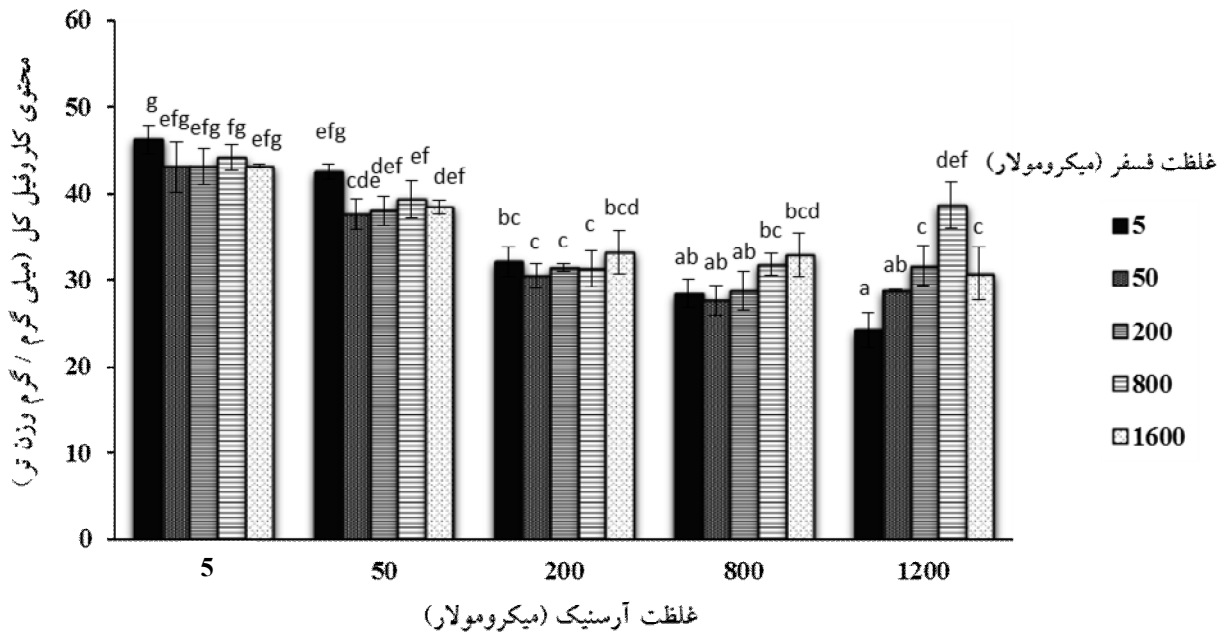
شکل ۳- اثر غلظت‌های مختلف آرسنیک و فسفر بر غلظت فسفر در گیاه *I. cappadocica*. حروف متفاوت هر ستون بیانگر معنی‌دار بودن اثر تیمارها بر میانگین غلظت فسفر در بخش هوایی گیاه، با استفاده از آزمون دانکن می‌باشد. مقادیر میانگین سه تکرار، \pm SE است.

(شکل ۵). محتوی پراکسید هیدروژن بخش هوایی تحت اثر غلظت‌های مختلف آرسنیک، دارای روند افزایشی در تیمارهای ۵، ۲۰۰، ۸۰۰ و ۱۲۰۰ میکرومولار می‌باشد، به نحوی که در تیمار ۱۲۰۰ میکرومولار آرسنیک و ۵ میکرومولار فسفر، محتوی پراکسید هیدروژن $4/82$ برابر تیمار ۰ میکرومولار آرسنیک و ۵ میکرومولار فسفر می‌باشد. اما با افزایش سطوح فسفر، این روند افزایشی کاهش یافته به طوری که کاهش میزان پراکسید هیدروژن در تیمارهای ۵۰، ۲۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میکرومولار محسوس بود.

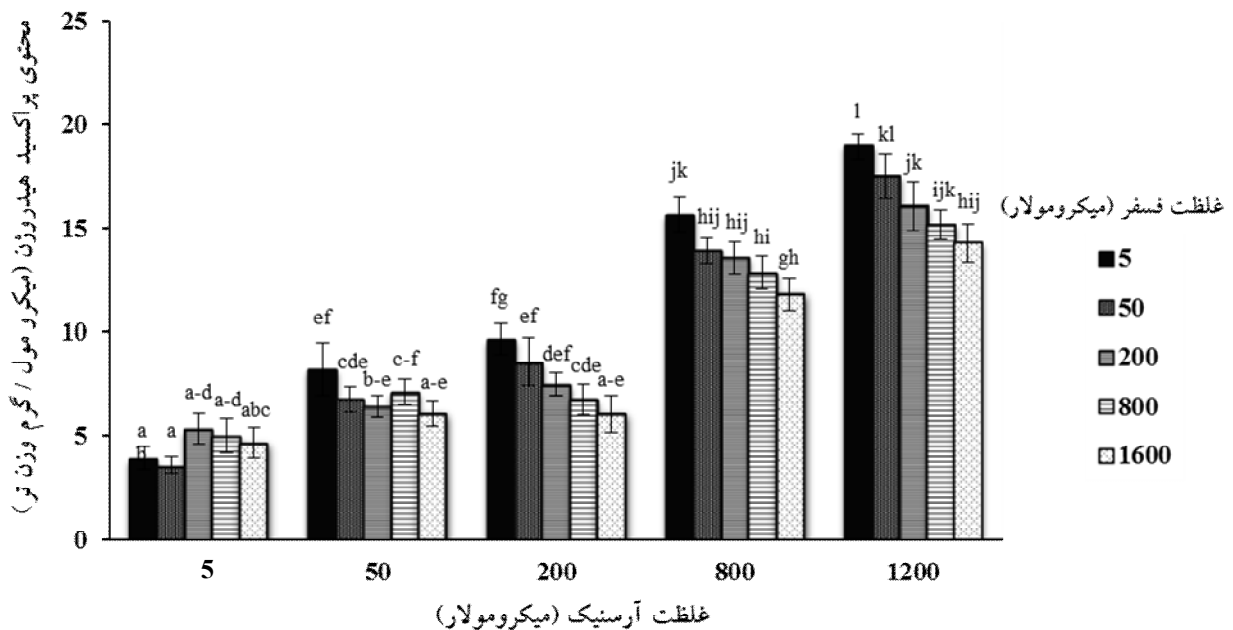
اثر غلظت‌های مختلف آرسنیک و فسفر بر محتوی مالون دی‌آلدئید: همان‌طور که در شکل ۶ ملاحظه می‌گردد، بیشترین میزان مالون دی‌آلدئید در مقایسه با سایر تیمارها، تیمار ۱۲۰۰ میکرومولار آرسنیک، ۵ میکرومولار فسفر با $397/98$ میکرومول بر گرم وزن تر است که $3/98$ برابر، تیمار صفر میکرومولار آرسنیک، ۱۶۰۰ میکرومولار فسفر می‌باشد. محتوی مالون دی‌آلدئید بخش هوایی تحت اثر غلظت‌های مختلف آرسنیک، دارای روند افزایشی در تیمارهای ۵۰، ۲۰۰، ۸۰۰ و ۱۲۰۰ میکرومولار می‌باشد، به طوری که در تیمار

کلروفیل **a** و **b** و کل: در گیاه *I. cappadocica*، با افزایش غلظت آرسنیک، میزان کلروفیل **a**، **b** و کل به طور نامحسوسی کاهش یافت. کمترین میزان کلروفیل در تیمار ۱۲۰۰ میکرومولار آرسنیک، ۵ میکرومولار فسفر و بیشترین میزان در تیمار ۰ میکرومولار آرسنیک، ۵ میکرومولار فسفر مشاهده گردید. محتوی کلروفیل، با افزایش غلظت آرسنیک کاهش یافته و به دنبال آن با افزایش غلظت فسفر در هر کدام از تیمارها، به طور نسبی روند افزایشی پیدا کرد به طوری که افزایش نسبی در تمام تیمارها به جز تیمار ۱۲۰۰ میکرومولار آرسنیک، ۸۰۰ میکرومولار فسفر مشاهده شد. اغلب تیمارها از نظر آماری با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشتند، این روند می‌تواند بیانگر مقاومت بالای گیاه، در برابر غلظت‌های مختلف آرسنیک باشد (شکل ۴).

اثر غلظت‌های مختلف آرسنیک و فسفر بر محتوی پراکسید هیدروژن: بیشترین میزان پراکسید هیدروژن در مقایسه با سایر تیمارها، تیمار ۱۲۰۰ میکرومولار آرسنیک، ۵ میکرومولار فسفر با $18/92$ میکرومول بر گرم وزن تر می‌باشد که $5/3$ برابر تیمار ۰ میکرومولار آرسنیک، ۵۰ میکرومولار فسفر است



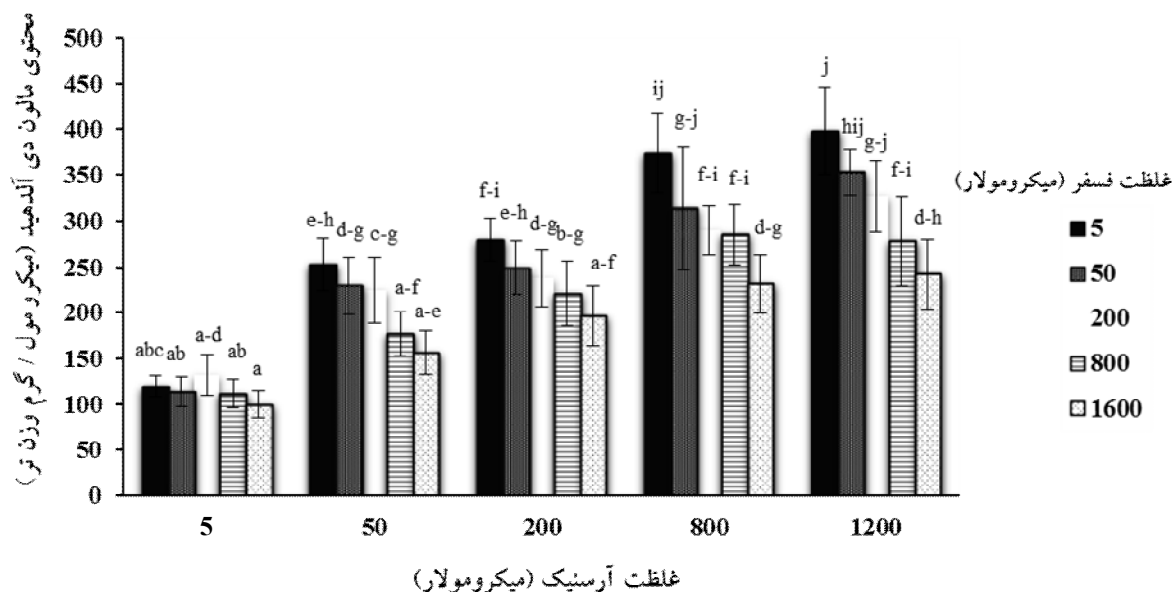
شکل ۴- اثر غلظت‌های مختلف آرسنیک و فسفر بر محتوی کلروفیل کل گیاه *I. cappadocica*. حروف مشابه هر ستون بیانگر معنی دار نبودن اثر تیمارها بر میانگین محتوی کلروفیل کل گیاه، با استفاده از آزمون دانکن می‌باشد. مقادیر میانگین سه تکرار، \pm SE است.



شکل ۵- اثر غلظت‌های مختلف آرسنیک و فسفر بر محتوی پراکسید هیدروژن (H_2O_2) گیاه *I. cappadocica*. حروف متفاوت هر ستون بیانگر معنی دار بودن اثر تیمارها بر میانگین بخش هوایی گیاه، با استفاده از آزمون دانکن می‌باشد. مقادیر میانگین سه تکرار، \pm SE است.

آلدهید در غلظت‌های ۵۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میکرومولار محسوس بود. از طرف دیگر تیمارهای ۸۰۰ و ۱۲۰۰ میکرومولار آرسنیک نسبت به سایر تیمارها، روند افزایشی محسوس تری داشته‌اند و افزایش غلظت فسفر در سطوح

۱۲۰۰ میکرومولار آرسنیک و ۵ میکرومولار فسفر، محتوی مالون دی‌آلدهید ۳/۳۱ برابر تیمار ۰ میکرومولار آرسنیک و ۵ میکرومولار فسفر می‌باشد. اما با افزایش سطوح فسفر، این روند افزایشی کاهش یافته به طوری که کاهش میزان مالون دی



شکل ۶- اثر غلظت‌های مختلف آرسنیک و فسفر بر محتوی مالون دی‌آلدئید (MDA) گیاه *I. cappadocica*. حروف متفاوت هر ستون بیانگر معنی‌دار بودن اثر تیمارها بر میانگین بخش هوایی گیاه، با استفاده از آزمون دانکن می‌باشد. مقادیر میانگین سه تکرار، \pm SE است.

در گیاه *I. cappadocica* باشد.

در این پژوهش در هر تیمار به موازات افزایش سطوح فسفر در محیط، میزان زیست توده افزایش یافت. با توجه به نقش فسفر به عنوان یک عنصر ضروری برای گیاه و همچنین نقش آن در کاهش جذب آرسنیک توسط سیستم جذبی فسفات، به نظر می‌رسد که با افزایش ورود فسفر به داخل سلولهای گیاه، شدت تنش اکسیداتیو و متعاقب آن تخریب بسیاری از پروتئین‌ها و آنزیم‌های کلیدی کاهش پیدا کرده است. از طرفی با توجه به نقش مهم فسفر در ساختمان غشای سلولی و حضور آن در ترکیباتی نظیر فسفولیپیدها، سیستم‌های جذبی گیاه عملکرد بهتری داشته و با جذب مناسب عناصر ضروری باعث بهبود رشد گیاه گردیده است.

محتوی کلروفیل a، b و کل، با افزایش سطوح آرسنیک در محیط به طور نسبی کاهش یافت و به دنبال آن با افزایش غلظت فسفر در هرکدام از تیمارها، روند افزایشی پیدا کرد. کمترین محتوی کلروفیل a، b و کل در تیمار ۱۲۰۰ میکرو-مولار آرسنیک، ۵ میکرومولار فسفر و بیشترین میزان در تیمار صفر میکرومولار آرسنیک، ۵ میکرومولار فسفر مشاهده گردید. کاهش محتوی کلروفیل و جلوگیری از فرایند فتوسنتز توسط فلزات سنگین در گیاهان عالی به ویژه گیاهان C_3 به

مختلف تا حدودی توانسته این روند افزایشی را بهبود بخشد، که به دلیل میزان بالای سمیت آرسنیک و شدت استرس اکسیداتیو در گیاه می‌باشد. نکته قابل توجه تشابه روند تغییرات محتوی پراکسید هیدروژن و مالون دی‌آلدئید در گیاه *I. cappadocica* است.

بحث:

اشکال قابل استفاده‌ی گیاهی آرسنیک (آرسنات و آرسنیت) می‌توانند در محلول خاک توسط گیاهان جذب شوند و به بخش هوایی، میوه‌ها و بذرها گیاهان از طریق آبیاری با آب‌های آلوده، راه یابند (Kim et al., 2009). مطالعات مختلف نشان داده است که حضور فسفات در مراحل رشد گیاه، اثرات زیادی بر جذب و تجمع آرسنیک دارد (Tu and Ma, 2003). برخلاف آرسنیک، فسفر جزء عناصر ضروری مورد نیاز گیاه به شمار می‌آید. آرسنات (+۵) به عنوان آنالوگ فسفات توسط سیستم انتقال دهنده‌ی فسفات در گیاه، جذب می‌شود (Macnair et al., 1992) و فسفات به عنوان مهار کننده‌ی رقابتی مؤثری برای جذب آرسنات به شمار می‌رود. بنابراین چگونگی توزیع آرسنیک و فسفر در گیاه، می‌تواند به عنوان یک سرنخ برای فهم بهتر نحوه‌ی انباشت آرسنیک و مقاومت

مشاهده گردید (Singh et al., 2006). همچنین کاهش محتوی کلروفیل کل در طی تنش آرسنیک در ذرت (Stoeva et al., 2004)، *Pteris semipinnata* (Loua et al., 2009) و برنج (Geng et al., 2006) گزارش شده است، که موافق نتایج حاصل از این پژوهش است.

تولید پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در پاسخ به گستره‌ی وسیعی از تنش‌های زیستی و غیر زیستی افزایش می‌یابد و تعدادی از محققین پیشنهاد می‌کنند که این ترکیب در گیاهان به عنوان مولکول پیام رسان دخیل در ترانس‌سانی علامت‌سازی، افزایش تحمل در برابر انواع تنش‌های غیر زیستی عمل می‌کند و در غلظت‌های بالا مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده را سازماندهی می‌کند (Vandenabeele et al., 2003). پراکسید هیدروژن به عنوان پایدارترین شکل اکسیژن فعال، قادر به انتشار سریع از عرض‌گشاها است (Foyer et al., 1997). این ترکیب به عنوان محصول فرعی در آپوپلاست، سیتوزول، کلروپلاست، میتوکندری و پراکسیزوم تولید می‌شود (Asada, 1999). پیشنهاد شده که پراکسید هیدروژن نقش مهمی در ممانعت رشد گیاهان تحت تنش فلزات سنگین، ایفا می‌کند (Chen et al., 2000) و به عنوان سوبسترا برای پراکسیدازها در سخت کردن دیواره‌ی سلولی شرکت می‌کند که منجر به محدودیت طویل شدن سلول می‌گردد. همچنین H_2O_2 بر تکثیر سلولی تأثیر منفی دارد (Santoro et al., 2005). از سوی دیگر تجمع بالای H_2O_2 در شرایط تنش اکسیداتیو با تحریک واکنش هابر-وییز و تولید رادیکال‌های خطرناک هیدروکسیل (OH^\cdot)، موجب پراکسیداسیون لیپیدها و آسیب‌های غشایی می‌گردد (Mittler, 2002). تلقیح فسفر می‌تواند در کاهش اکسیژن رادیکالی و تیول‌های غیر پروتئینی که تحت تنش آرسنیک افزایش می‌یابند، مؤثر باشد (Hartley-Whitaker et al., 2001).

بررسی نتایج حاصل از گیاه *I. cappadocica* تحت تنش آرسنیک نشان می‌دهد، پایین‌تر بودن محتوی پراکسید هیدروژن در تیمارهای ۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار به این دلیل می‌باشد که احتمالاً فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در این وضعیت بالا بوده و حذف H_2O_2 در اندامک‌های سلولی به نحو بهتری

خوبی مشخص شد است (Connell et al., 2001). افزایش غلظت آرسنیک باعث تغییر شکل کلروپلاست، گرد شدن و کوتاه شدن محور طولی سلول، تو رفتگی غشاء، خمیدگی و تخریب غشاء شده که در نتیجه موجب کاهش محتوی کلروفیل برگ می‌گردد (Miteva and Merakchysk, 2002). همچنین تغییر در نفوذپذیری غشای کلروپلاست به علت پراکسیداسیون لیپیدها، در واکنش به سمیت آرسنیک، می‌تواند در کاهش محتوی رنگیزه‌ی گیاه دخیل باشد. انواع اکسیژن فعال که به طور مستقیم و یا غیر مستقیم در اثر تنش آرسنیک ایجاد می‌شوند، آسیب جدی به اجزای مختلف سلولی به ویژه غشاهای زیستی از جمله غشاهای تیلاکوئیدی در پروتوپلاست‌ها وارد می‌کنند (Stoeva et al., 2003). انتقال یون فلزی به اندام‌های هوایی و در نهایت تجمع آن در سلول‌های برگ، باعث بروز علائم مورفولوژیک و فیزیولوژیک تنش در برگ‌ها می‌شود که از شاخص‌ترین این علائم می‌توان به نکروز و کلروز شدن برگ‌ها اشاره کرد (Bergmann, 2004).

مطالعات انجام شده بر روی گندم و لوبیا نشان می‌دهد که کلروز ایجاد شده در این گیاهان، نتیجه‌ی القای تنش اکسیداتیو توسط آرسنیک بوده که منجر به کاهش محتوی کلروفیل برگ‌ها، تغییر شکل کلروپلاست و تخریب ساختار کاروتنوئیدها می‌گردد (Liu et al., 2008; Miteva and Merakchyska, 2002). کاهش میزان کلروفیل b، کارایی به دام انداختن انرژی توسط فتوسیستم II را کاهش می‌دهد (Dube et al., 2003; Kranner, 2011). در این تحقیق محتوی کلروفیل اغلب تیمار-ها از نظر آماری با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشتند، این روند بیانگر مقاومت بالای *I. cappadocica* در برابر سطوح مختلف آرسنیک می‌باشد. البته به دنبال افزایش تنش اکسیداتیو ایجاد شده در سطوح بالای آرسنیک به ویژه در تیمار ۱۲۰۰ میکرومولار به همراه غلظت‌های کم فسفر، محتوی کلروفیل گیاه کاهش پیدا کرد، که این امر می‌تواند در ارتباط با پراکسیداسیون غشای تیلاکوئیدی و افزایش تجمع آرسنیک در بخش هوایی گیاه باشد. در سرخس بیش‌انباشتگر *P. vittata* کاهش محتوی کلروفیل a، b و کل با افزایش غلظت آرسنیک،

اکسیداسیون توسط انواع اکسیژن فعال حساس هستند، بنابراین حضور سطوح افزایش یافته‌ی مالون دی آلدئید به عنوان محصول پراکسیداسیون لیپیدی، معرف تنش شدید اکسیداتیو در نظر گرفته می‌شود (Behnamnia et al., 2009). فعالیت ژن های گیاهی که در اثر آلودگی فلزات بیان می‌شوند، باعث تولید آنزیم‌های پراکسیدازی مانند آلفا دی‌اکسیژناز، پراکسیداز و لیپو اکسیژناز شده و این آنزیم‌ها با پراکسیداسیون لیپیدهای غیر اشباع، باعث وارد کردن آسیب به غشای سلولی می‌گردند. افزایش محتوی مالون دی‌آلدئید در سطوح بالای آرسنیک، می‌تواند ناشی از فعالیت آنزیم لیپوآکسیژناز (LOX) باشد. طبق گزارش، افزایش فعالیت LOX تحت شرایط تنش منجر به اکسیداسیون اسیدهای چرب متصل به غشاء و انتشار پر اکسیداسیون لیپیدها می‌گردد (Molassiotis et al., 2006). مطالعات نشان داده که حضور آرسنیک باعث تشکیل گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) و در نتیجه پراکسیداسیون لیپیدها می‌شود (Singh et al., 2007). شکل‌گیری ROS می‌تواند منجر به مهار فعالیت آنزیم‌های کلیدی، همراه با نشت الکترون در طول تبدیل آرسنات به آرسنیت شود (Halliwell and Gutteridge, 1984). تشابه روند تغییرات محتوی پراکسید هیدروژن و مالون دی آلدئید در گیاه *J. cappadocica* تأیید کننده‌ی این مطلب است که به موازات افزایش تنش اکسیداتیو و تولید پراکسید هیدروژن، میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی افزایش پیدا کرده است. این نتایج در توافق نتایج (Ma et al., 2006) که بر روی سرخس *Pteris vittata* صورت گرفته، می‌باشد.

نتیجه‌گیری کلی:

در این تحقیق محتوی کلروفیل کل اغلب تیمارها با یکدیگر اختلاف معنی داری نداشتند، این روند بیانگر مقاومت بالای *J. cappadocica* در برابر سطوح مختلف آرسنیک می‌باشد. به طور کلی با افزایش سطوح آرسنیک در محیط، میزان تجمع مالون دی آلدئید افزایش یافت. از سوی دیگر افزایش کمتر مالون دی آلدئید در سطوح بالای فسفر، حفاظت بهتری در برابر آسیب‌های اکسیداتیو در طول تنش را پیشنهاد می‌کند. تشابه روند تغییرات محتوی پراکسید هیدروژن و مالون دی

صورت گرفته است. از سوی دیگر محتوی پراکسید هیدروژن در سطوح بالای آرسنیک به علت شدت تنش اکسیداتیو افزایش پیدا کرد.

در این پژوهش محتوی مالون دی آلدئید بخش هوایی تحت اثر غلظت‌های مختلف آرسنیک، دارای روند افزایشی در تیمارهای ۵۰ تا ۱۲۰۰ میکرومولار بود، به طوری که در تیمار ۱۲۰۰ میکرومولار آرسنیک و ۵ میکرومولار فسفر، محتوی مالون دی آلدئید ۳/۳۱ برابر تیمار ۰ میکرومولار آرسنیک و ۵ میکرومولار فسفر گردید. اما با افزایش سطوح فسفر، این روند افزایشی، کاهش یافت و افزایش غلظت فسفر در سطوح مختلف تا حدودی توانست این روند افزایشی را بهبود بخشد، که می‌تواند به دلیل میزان بالای سمیت آرسنیک و شدت تنش اکسیداتیو در گیاه باشد. از سوی دیگر افزایش کمتر مالون دی آلدئید در سطوح بالای فسفر، حفاظت بهتری در برابر آسیب های اکسیداتیو در طول تنش را پیشنهاد می‌کند. عدم تغییر معنی دار میزان پراکسیداسیون لیپیدها در تیمارهای ۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار آرسنیک، احتمالاً به دلیل وجود مکانیسم‌های دفاعی از جمله سیستم آنتی اکسیدانی می‌باشد.

تغییرات بیوشیمیایی هنگامی رخ می‌دهد، که گیاه در معرض تنش‌های زیستی و غیر زیستی قرار می‌گیرد و انواع گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) تولید می‌شوند (Allen, 1995). رادیکال‌های آزاد، متابولیسم سلولی را از طریق پراکسیداسیدن لیپیدها، واسرشته کردن پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک، برهم می‌زنند (Bor et al., 2003). پراکسیداسیون لیپیدها منجر به تجزیه و تخریب ترکیبات ساختاری می‌گردد (Stein, 1993) (Lester and Weckx and Clijsters, 1993). این وضعیت باعث تغییر در نفوذپذیری انتخابی غشاهای زیستی می‌شود (Weckx and Clijsters, 1993). مالون دی‌آلدئید (MDA)، واحد اندازه‌گیری پراکسیداسیون لیپیدها، شاخص آسیب غشایی می‌باشد که به صورت افزایش نشت الکتروولت بیان می‌گردد (Tiburcio et al., 1994). بنابراین پایداری غشاهای سلولی به طور گسترده‌ای در گونه‌های حساس و مقاوم نسبت به تنش‌های مختلف در گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرد (Liang et al., 2003). به طور کلی ماکرومولکول‌های لیپیدی، به ویژه لیپیدهای غیر اشباع نسبت به

میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی افزایش پیدا کرده است.

آلدهید در این گیاه، تأیید کننده‌ی این مطلب است که به موازات افزایش تنش اکسیداتیو و تولید پراکسید هیدروژن،

منابع:

- Halliwell, B. and Gutteridge, M. C. (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemistry* 219: 1-14.
- 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, Environment* 24: 713-722.
- Heath, R. L. and Packer, L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125: 189-198.
- Herbinger, K. Tausz, M. Wonisch, A. Soja, G. Sorger, A. and Grill, D. (2002) Complex interactive effects of drought and ozone stress on the antioxidant defense systems of two wheat cultivars. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 691-696.
- Jain, M. and Gadre, R. (2004) Inhibition of 5-amino levulinic acid dehydratase activity by arsenic in excised etiolated maize leaf segments during greening. *Plant Physiology* 161: 251-255.
- 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, identify two angiosperm arsenic hyperaccumulators. *International Journal 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 Plant Growth Regulation* 32:823-830.
- Karimi, N., Ghaderian, S. M., Raab, A., Feldmann, J. and Meharg, A. A. (2009) An arsenic accumulating, hyper-tolerant brassica, *Isatis cappadocica* Desv. *New Phytologist* 184: 41-47.
- Kim, K. W., Bang, S., Zhu, Y., Meharg, A. A. and Bhattacharya, P. (2009) Arsenic geochemistry, transport mechanisms in the soil- plant system, human and animal health issues. *Environmental International* 35: 453-454.
- Kranner, I. and Colville, L. (2011) Metals and seeds: Biochemical and molecular implication and their significance for seed germination. *Environmental and Experimental Botany* 72:93-105.
- Lester, G. E. and Stein, F. (1993) Plasma membrane physicochemical changes during maturation and posharvest storage of muskmelon fruit. *American Society For Horticultural Science* 118: 223-227.
- Liang, Y. C. Chen, Q. Liu, Q. Zhang, W. and Ding, R. (2003) Exogenous silicon (Si) increases antioxidant enzyme activity and reduced lipid peroxidation in roots of salt-stressed barley (*Hordeum vulgar* L.). *Plant Physiology* 160: 1157-1164.
- Lihong, W. and Guilan, D. (2009) Effect of external and internal phosphate status on arsenic toxicity and
- مهدیه، ش. قادریان، م. کریمی، ن. (۱۳۹۱) بررسی اثر فسفر بر جذب و تجمع آرسنیک در دو رقم گندم (*Triticum aestivum* L.). *مجله‌ی پژوهش‌های تولید گیاهی* ۲: ۱۰۵-۱۲۲.
- Allen, R (1995) Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiology* 107: 1049-1054.
- Arnon, D. I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplast polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 24:1-15.
- Asada, K (1999) The water-water cycle in chloroplasts scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology, Plant Molecular Biology* 50: 601-639.
- Behnamnia, M., Manouchehri Kalantari, K. and Ziaie, J. (2009) Effects of brassinosteroid on the induction of biochemical changes in *Lycopersicon esculentum* under drought stress. *Turk Botany* 33: 417-428.
- Bergmann, D. C. (2004) Integrating signals in stomatal development. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 26-32.
- Bor, M., Özdemir, F. and Tükan, I. (2003) The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leave of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritime* L. *Plant Science* 163: 77-84.
- Chen, L. M., Lin, C. C. and Kao, C. H. (2000) Copper toxicity in rice seedlings: Changes in antioxidative enzyme activities, H₂O₂ level, and cell wall peroxidase activity in roots. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 41: 99-103.
- Connell, S. L. and AL-Hamdani, S. H. (2001) Selected physiological responses of Kudzu to different chromium concentration. *Canadian Journal of Plant Science* 81: 33-58.
- Dube, B, K., Tawari, K. and Chatterje, C. (2003) Excess chromium alters uptake and translocation of certain nutrients in citrullus. *Chemosphere* 53: 1147-1153.
- Foyer, C. H., Lopez-Del Gad, H., Dat, J. E., Dat, I. and Scott, M. (1997) Hydrogen peroxidase and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signaling. *Physiologia Plantarum* 100: 241-245.
- Geng, C. N., Zhu, Y. G., Hu, Y., Williams, P. and Meharg, A. A. (2006) Arsenate causes differential acut toxicity to two P-deprived genotype of rice seedling (*Oryza sativa* L.). *Plant Soil* 279: 297-306.
- Gunes, A., Pilbeam, D. J. and Inal, A. (2009) Effect of arsenic- phosphorus interaction on arsenic- induced oxidative stress in chickpea plants. *Plant and Soil* 314: 211-220.

- Roy, P. and Saha, A. (2002) Metabolism and Toxicity of Arsenic: A Human Carcinogen. *Current Science* 82: 38-45.
- Santoro, A. Lioi, M. B. Monfregola, J. Salzano, S. Barbieri, R. and Ursini, M. V (2005) L- Carnitine protects mammalian cells from chromosome aberrations but not from inhibition of cell proliferation induced by hydrogen peroxide. *Mutation Research* 587: 16-25.
- 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.
- Singh, H. P., Batish, D. R., Kohli, 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* 5: 65-73.
- 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.
- Stoeva, N. and Bineva, T. Z. (2003) Oxidative changes and photosynthesis in Oat plants grow in as contaminated soil. *Plant Physiology* 29: 87-95.
- Tiburcio, A. F., Besford, R. T., Capell, T., Borrell, A., Testillano, P. S. and Risueno, M. C. (1994) Mechanisms of polyamine action during senescence responses induced by osmotic stress. *Experimental Botany* 45: 1789-1800.
- Tu, C. and Ma, L. Q. (2003) Effects of arsenate and phosphate on their accumulation by an arsenic-hyperaccumulator *Pteris vittata* L. *Plant Soil* 249: 373-382.
- Vandenabeele, S., Van Der Kelen, K., Dat, J., Gadjev, I., Boonefaes, T., Morsa, S., Rottiers, P., Slooten, L., Van Montagu, M., Zabeau, M., Inze, D. and Van Breusegen, F. (2003) A comprehensive analysis of hydrogen peroxide-induced gene expression in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 23: 138-161.
- Weckx, J. E. J. and Clijsters, H. M. M. (1993) Zn phytotoxicity induced oxidative stress in primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology, Biochemistry* 35: 405-410.
- Zhao, F. J., Ma, J. F., Meharg, A. A. and McGrath, S. P (2009) Arsenic uptake and metabolism in plants. *New Phytologist* 181: 777-794.
- accumulation in rice seedlings. *Journal of Environmental Sciences* 21: 349-351.
- Liu, Q., Hu, C., Tan, Q., Sun, X., Su, J. and Liang, Y. (2008) Effects of as on as uptake, speciation and nutrient by winter wheat (*Triticum aestivum*) under arsenate co-contamination. *Ecotoxicology Environmental Safety* 68: 505-313.
- Loua, I. Q., Yec, Z. H. and Wonga, M. H. (2009) A comparison of arsenic tolerance, uptake and accumulation between arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L and non-hyperaccumulator *P. semipinnata* L. A hydroponic study. *Hazardous Materials* 171: 436-442.
- 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.
- Macnair, M. R., Cumbes, Q. J. and Meharg, A. A. (1992) The genetics of arsenate tolerance in Yorkshire fog, *Holcus lanatus* L. *Heredity* 69: 325-335.
- Meharg, A. A. and Macnair M. R. (1992) Genetic correlation between arsenate tolerance and the rate of arsenate and phosphate uptake in *Holcus lanatus* L. *Heredity*. 69: 336-341.
- Meharg, A. A. and Jardine, L. (2003) Arsenite transport into paddy rice (*Oryza sativa*) roots. *New Phytologist* 157: 39-44.
- Mishra, S. and Dubey, R. S. (2006) Inhibition of ribonuclease and protease activities in arsenic-exposed rice seedlings: role of proline as enzyme protectant. *Plant Physiology* 163:927-936.
- Miteva, E. and Merakchysk, M. (2002) Response of chloroplasts and photosynthetic mechanism of bean plants to excess arsenic in soil. *Bulgarian Agricultural Science* 8: 151-156.
- Mithofer, A., Schulze, B. and Boland, W. (2004) Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. *FEBS Letters* 566: 1-5.
- Mittler, R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Science* 7: 405-410.
- Molassiotis, A. Sotiropoulos, T. Tanou, G. Diamantidis, G and Therios, I. (2006) Boron- induced oxidative damage and antioxidant and nucleolytic responses in shoot tips culture of the Apple rootstock EM9 (*Malus domestica* Borkh). *Environmental Experimental Botany* 56: 54-62.
- Morel, F. M. M. (2008) The co-evolution of phytoplankton and trace element cycle in the oceans. *Geobiology* 6: 318-24.