تاثیر نیتروپروساید بر تنش اکسیداتیو القا شده توسط آرسنیک در گیاهچه‌های گندم

منصوره صدرایی[۱]، احمد مهربان[۱*] و ابولفضل توسلی[۲]

[۱] **ایران، زاهدان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زاهدان**

[۲] **ایران، زاهدان، دانشگاه پیام نور واحد زاهدان دانشکده کشاورزی**

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۳/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۲۴

چکیده

در این تحقیق، نقش تنظیمی احتمالی نیتروپروساید (NO) در کاهش تنش اکسیداتیو گیاهچه‌های گندم تحت سمیت آرسنیک مورد بررسی قرار گرفت. گیاهچه‌های ۲۰ روزه گندم تحت تیمار آرسنیک (۰، ۲۵ و ۵۰ میکرومولار) و نیتروپروساید (۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) قرار گرفتند و به صورت هیدروپونیک به مدت ۲۰ روز در این شرایط رشد کردند. تیمار آرسنیک باعث کاهش محتوای نسبی آب و کلروفیل و افزایش محتوای پرولین شد. آرسنیک (۵۰ میکرومولار) همچنین باعث افزایش محتوای مالون دی آلدئید (۱۷۳٪)، پراکسید هیدروژن (۱۹۴٪)، گلوتاتیون احیا شده (۸۹٪) و گلوتاتیون اکسید شده (۱۳۸٪) شد، درحالی که باعث کاهش آسکوربیک اسید (۴۱٪) و نسبت گلوتاتیون احیا شده به اکسید شده (۲۱٪) نسبت به تیمار شاهد شد. افزایش غلظت آرسنیک باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز، گلوتاتیون S-ترانسفراز و آسکوربات پراکسیداز شد. فعالیت دهیدروآسکوربات ردوکتاز و گلی اکسالاز I در هر دو سطوح آرسنیک کاهش یافت درحالیکه گلوتاتیون پراکسیداز و گلی اکسالاز II فقط تحت غلظت ۵۰ میکرومولار آرسنیک کاهش یافت. تیمار نیتروپروساید باعث افزایش محتوای نسبی آب، کلروفیل، پرولین، محتوای آسکوربیک اسید و گلوتاتیون، و همچنین بهبود فعالیت آنزیم‌های دهیدروآسکوربات ردوکتاز، مونودهیدروآسکوربات ردوکتاز، گلوتاتیون پراکسیداز، کاتالاز و گلی اکسالاز I و II در گیاهچه‌های گندم تحت سمیت آرسنیک شد. این نتایج پیشنهاد می‌کند که نیتروپروساید باعث افزایش تحمل گیاه به آسیب تنش اکسیداتیو حاصل از سمیت آرسنیک از طریق افزایش سیستم دفاعی آنتی اکسیدان و مسیر گلی اکسالاز شد که در نهایت باعث بهبود رشد گیاه شد.

واژه های کلیدی: آنزیم‌های آنتی اکسیدان، سمیت فلزات سنگین، سیستم گلی‌اکسالاز، گندم، نیتروپروساید سدیم

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۵۳۴۱۱۱۳۴، پست الکترونیکی: a.mehraban@iauzah.ac.ir

مقدمه

از آنجایی که تنش‌های غیرزیستی مانند شوری، خشکی و سمیت فلزات سنگین تاثیر منفی بر رشد، تولید زیست‌توده و عملکرد گیاهان دارند، امروزه شناخت پاسخ گیاهان به این تنش‌های غیرزیستی اهمیت زیادی دارد (۲۸). با توجه به نوع زندگی گیاهان و ثابت بودن آنها در خاک، مکانیسم-های محدودی برای مقابله با تنش‌های مختلف دارند. درک مکانیسم دریافت سیگنال‌های محیطی توسط گیاهان و انتقال آنها به بخش‌های مختلف سلولی برای فعال‌کردن پاسخ‌های سازشی گیاه، می‌تواند اهمیت زیادی برای توسعه استراتژی‌های اصلاحی و ترانس‌ژنتیک به منظور افزایش تحمل گیاهان زراعی به تنش‌های محیطی داشته باشد (۱۵).

در دهه‌های اخیر، آلودگی فلزات سمی در خاک، تبدیل به یک مشکل جدی در تولید محصولات کشاورزی در سراسر جهان شده است. آرسنیک (As) یکی از سمی‌ترین فلزات سنگین است که به طور گسترده در طبیعت وجود دارد و سمیت زیادی برای تمام موجودات زنده دارد. اگرچه آرسنیک به طور مستقیم در فرآیند متابولیکی خاصی

نقشی ندارد و یا با سیستم آنزیمی خاصی در ارتباط نیست، غلظت بالای آرسنیک در خاک یا محلول غذایی توسط انتقال‌دهنده‌های فسفات در گیاهان جذب می‌شود که در نتیجه باعث تاثیر منفی بر فرآیندهای متابولیکی و ممانعت رشد و حتی مرگ در گیاهان می‌شود (۴۵). گیاهانی که در خاک‌های حاوی غلظت بالای آرسنیک رشد می‌کنند علائم ظاهری شامل کلروز و ممانعت رشد را نشان می‌دهند. آرسنیک از انتقال آب ممانعت می‌کند و با القای تنش آبی در گیاه، باعث تجمع پرولین و دیگر اسمولیت‌ها در گیاه می‌شود (۴۵). آرسنیک همچنین تولید انواع اکسیژن‌های فعال مانند اکسیژن منفرد، رادیکال سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال هیدروکسیل را در گیاه القا می‌کند که باعث ایجاد تنش اکسیداتیو در گیاهان می‌شود. متیل گلی-اگسال یکی دیگر از ترکیبات بسیار سمی در گیاهان است که تحت سمیت فلزات سنگین به میزان زیادی تجمع می‌یابد (۴۹). هر دو ترکیبات انواع اکسیژن فعال و متیل گلی‌اکسال برای سلول‌های گیاه بسیار سمی هستند و در غیاب مکانیسم محافظتی، با ماکرومولکول‌های مهم سلولی مانند پروتئین‌ها، لیپیدها و DNA واکنش می‌دهند و باعث آسیب به آنها می‌شود (۴۹).

برای جلوگیری از آسیب‌های سلولی ناشی از رادیکال‌ها آزاد، گیاهان دارای متابولیت‌های آنتی اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی هستند که نقش مهمی در خنثی‌سازی رادیکال-های آزاد دارند (۲۸). سیستم دفاعی آنتی اکسیدان گیاهان شامل آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پروکسیداز، گلوتاتیون S-ترانسفراز و چهار آنزیم چرخه آسکوربات-گلوتاتیون (آسکوربات پراکسیداز، مونو دهیدروآسکوربات ردوکتاز، دهیدروآسکوربات ردوکتاز و گلوتاتیون ردوکتاز) و به همراه ترکیبات غیرآنزیمی مانند گلوتاتیون و آسکوربات می‌باشد (۶، ۳۴). در گیاهان، متیل گلی‌اکسال عمدتاً با حفظ همئوستازی گلوتاتیون به وسیله سیستم گلی اکسالاز سمیت‌زدایی می‌شوند که شامل دو آنزیم، گلی اکسالاز I و II می‌باشد (۴۹). آنزیم گلی اکسالاز I با استفاده از گلوتاتیون احیاشده، متیل گلی‌اکسال را به S-D-لاکتوگلوتاتیون تبدیل می‌کند، و سپس آنزیم گلی اکسالاز II ترکیب S-D-لاکتوگلوتاتیون را با احیای یک گلوتاتیون به D-لاکتات تبدیل می‌کند (۳۰). نشان داده شده است که آنزیم‌های سیستم گلی اکسالاز در پاسخ گیاهان به تنش‌های مختلف محیطی از جمله فلزات سنگین نقش مهمی دارند (۳۷). همچنین گزارش شده است که تنظیم یا القای هماهنگ هر دو مسیر آنتی اکسیدان و گلی اکسالاز برای تحمل گیاهان در مقابل تنش‌های اکسیداتیو ضروری هستند (۱۵).

اخیرا مونوکسید نیتروژن (NO) به عنوان یک مولکول پیامبر مهم شناخته است که گزارشات متعددی نشان داده است که کاربرد خارجی ترکیبات آزادکننده مونوکسید نیتروژن باعث تحمل گیاه به تنش‌های غیرزستی می‌شود (۱۵، ۱۶). چندین مطالعه ثابت کرده است که نقش محافظتی مونوکسید نیتروژن در مقابل تنش‌های زیستی تا حد زیادی مربوط به کاهش انواع رادیکال‌های آزاد القا شده توسط مونوکسید نیتروژن در گیاهان است (۵). نتایج چندین تحقیق نشان داد که کاربرد خارجی مونوکسید نیتروژن در فرم‌ها و غلظت‌های مختلف به گیاه در مقابله با اثرات زیان‌بار سمیت فلزات سنگین از طریق کاهش جذب و تجمع فلزات سنگین و تقلیل تنش اکسیداتیو حاصل از فلز سنگین کمک می‌کند (۴۷). علاوه براین، مونوکسید نیتروژن از سلول‌های گیاهی در مقابل تنش اکسیداتیو با تحریک سنتز گلوتاتیون محافظت می‌کند (۲۱). مطالعات اخیر نشان داد گلوتاتیون نقش مهمی در تنظیم سطح متیل گلی‌اکسالاز و افزایش تحمل تنش اکسیداتیو در گیاهان بازی می‌کند (۱۷). از آنجائی که اولین آنزیم مسیر گلی‌اکسالاز (گلی اکسالاز I) از گلوتاتیون به عنوان یک کوفاکتور در طی سمیت زدایی متیل اکسال استفاده می‌کند، تصور می‌شود که تحریک سنتز گلوتاتیون توسط مونواکسید نیتروژن ممکن است نقش مهمی در سمیت‌زدایی متیل اکسال به وسیله آنزیم‌های مسیر گلی

اکسالاز ایفا کند (۴۹). با توجه به سمیت آرسنیک بر رشد گیاه، نقش سدیم نیتروپروساید (SNP) به عنوان یک آنتی-اکسیدان موثر و با تاثیرات مطلوب، در کاهش تنش اکسیداتیو ناشی از قرار گرفتن گیاهچه‌های گندم در شرایط سمیت آرسنیک مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

این پژوهش به صورت هیدروپونیک در سال ۱۳۹۷ در گلخانه دانشگاه پیام نور زاهدان به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار به صورت گلخانه‌ای انجام گرفت. تیمارها شامل آرسنیک (دی سدیم آرسنات (Na_2HAsO_4) در سه غلظت (صفر، ۲۵ و ۵۰ میکرومولار دی‌سدیم آرسنات به ترتیب شامل ۰، ۰/۰۳۸ و ۰/۰۷۵ میلی‌گرم بر لیتر آرسنیک خالص) و سدیم نیتروپروساید $(Na_2[Fe(CN)_5NO].2H_2O)$ در سه غلظت (صفر، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار به ترتیب به میزان ۰، ۱۳/۱ و ۲۶/۲ میلی-گرم بر لیتر نیتروپروساید) به صورت کشت هیدروپونیک بر روی گیاه گندم رقم هامون به طور همزمان اعمال شدند. برای جلوگیری از افزایش غلظت سدیم و القای تنش در زمان اعمال تیمارها، غلظت سدیم‌های موجود در ترکیات دی‌سدیم آرسنات و نیتروپروساید تحت هر تیمار محاسبه شد و به همان میزان از غلظت سدیم در زمان ساخت محلول هوگلند کاسته شد (از مولیبدات به جای سدیم مولیبدات استفاده شد).

کشت گیاه و اعمال تیمار: بذرهای گندم رقم هامون بعد از ضدعفونی، در سینی‌های مخصوص جوانه‌دار شدند و بعد از ۱۰ روز، گیاهچه‌های یک دست انتخاب و در گلدان‌های پلاستیکی دو لیتری مخصوص (دو گیاهچه در هر گلدان) به منظور کشت هیدروپونیک انتقال داده شدند. از محیط کشت هوگلند برای کشت هیدروپونیک استفاده شد و برای هوادهی از پمپ هوا استفاده شد. pH محیط کشت روزانه بررسی شد و هر پنج روز محلول گلدان‌ها تعویض شدند. ۱۰ روز بعد از کاشتن گیاهچه‌ها و سازگاری با شرایط گلدان‌ها، تیمارها اعمال شدند. بعد از ۲۰ روز اعمال تیمارها، نمونه‌برداری انجام شد. وزن خشک نمونه‌ها بعد از خشک کردن در آون اندازه‌گیری شد. برای انجام آزمایشات بیوشیمیایی نمونه‌های تازه در فریزر و دمای ۸۰- نگهداری شدند.

رنگیزه‌های فتوسنتزی، پرولین و محتوای نسبی آب (RWC): محتوای کلروفیل a و b با استفاده از هموژن شدن نمونه‌های برگ (۰/۵ گرم) با ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد و سپس سانتریفیوژ در ۱۰۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه تعیین شد. جذب محلول رویی در طول موج‌های ۶۶۳ و ۶۴۵ نانومتر اندازه‌گیری شد و محتوای رنگیزه‌ها محاسبه گردید (۲). جهت اندازه‌گیری پرولین آزاد از عصاره الکلی برگ استفاده شد. پرولین با قرائت جذب واکنش نین‌هیدرین در طول موج ۵۱۵ نانومتر محاسبه شد (۳). برای تعیین محتوای نسبی آب برگ از جوان‌ترین برگ بالغ در هر گیاه تعداد پنج دیسک برگی تهیه و برای تعیین وزن تر نمونه‌ها، بلافاصله وزن شدند (FW)، سپس تمامی نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق و در تاریکی در آب مقطر غوطه‌ور گردیده و وزن اشباع آنها اندازه‌گیری شد (TM). بعد از آن نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد در آون خشک شدند و وزن خشک آنها تعیین گردید (DW). با استفاده از رابطه‌های زیر، میزان RWC محاسبه شد (۳۸).

$$\text{RWC (\%)} = \left[\frac{(FW-DW)}{(TM-DW)}\right] \times 100$$

پراکسیداسیون لیپید و پراکسید هیدروژن (H_2O_2): با تعیین محتوای مالون دی آلدئید (MDA) با استفاده از روش اسید تیوباربیتوریک و ضریب خاموشی $mM^{-1}cm^{-1}$ ۱۵۵[1]، میزان پراکسیداسیون لیپید غشا اندازه‌گیری شد (۱۸). پراکسید هیدروژن با هموژنیزه شدن ۰/۵ گرم برگ تازه گیاه با ۳ میلی‌لیتر بافر پتاسیم–فسفات ۵۰ میلی‌مولار در دمای ۴ درجه و سانتریفیوژ شدن در ۱۱۵۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه عصاره‌گیری شد. سپس ۳ میلی‌لیتر از محلول

رویی با یک میلی‌لیتر از محلول $TiCl_4$ ۱ درصد مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. بعد از سانتریفیوژ در ۱۵۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه، میزان جذب محلول رویی در طول موج ۴۱۰ نانومتر خوانده شد (۵۰).

آسکوربات و گلوتامات: نمونه تازه برگی (۰/۵ گرم) در سه میلی‌لیتر بافر اسیدی (۵٪ متا-فسفریک اسید شامل یک میلی‌مولار EDTA) هموژن شد. بعد از سانتریفیوژ در ۱۱۵۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، از محلول رویی برای آنالیز آسکوربات و گلوتاتیون استفاده شد. بعد از خنثی‌سازی محلول رویی با بافر پتاسیم-فسفات ۰/۵ میلی‌مولار (pH 7)، جذب محلول با استفاده از اسپکتوفتومتر در طول موج ۲۶۵ نانومتر خوانده شد و با استفاده از منحنی استاندارد آسکوربات، محتوای آسکوربات محاسبه گردید (۲۲). محتوای گلوتاتیون با قرائت در طول موج ۴۱۲ نانومتر مطابق روش قبلا توضیح داده شده، اندازه‌گیری شد (۵۰).

عصاره آنزیمی و سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان: بافت تازه برگ (۰/۵ گرم) در یک میلی‌لیتر از بافر پتاسیم-فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH 7) شامل KCl ۱۰۰ میلی‌مولار، آسکوربات ۱ میلی‌مولار، بتا-مرکاپتواتانول ۵ میلی‌مولار و گلیسرول ۱۰ درصد هموژن شد. از محلول رویی بعد از سانتریفیوژ در ۱۱۵۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه برای تعیین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان استفاده شد.

محلول واکنش شامل بافر پتاسیم-فسفات ۵۰ میلی‌مولار، آسکوربات ۰/۵ میلی‌مولار، پراکسید هیدروژن ۰/۱ میلی-مولار، EDTA 1/0 میلی‌مولار و عصاره آنزیمی در حجم نهایی ۷۰۰ میکرولیتر می‌باشد. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز براساس میزان کاهش در جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر به مدت یک دقیقه محاسبه شد (۳۱).

فعالیت آنزیم مونودهیدروآسکوربات ردوکتاز با محلول واکنش شامل بافر Tris-HCl 50 میلی‌مولار (pH 7.5)، NADPH ۰/۲ میلی‌مولار، آسکوربات ۲/۵ میلی‌مولار، ۰/۵ واحد آسکوربات اکسیداز و عصاره آنزیمی در حجم نهایی ۷۰۰ میکرولیتر اندازه‌گیری شد. با توجه به تغییر در جذب ۳۴۰ نانومتر به میزان یک دقیقه، فعالیت آنزیم مونودهیدروآسکوربات ردوکتاز محاسبه شد (۱۹).

محلول واکنش برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم دهیدروآسکوربات ردوکتاز شامل بافر پتاسیم-فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH 7)، گلوتاتیون ۲/۵ میلی‌مولار و دهیدروآسکوربات ۰/۱ میلی‌مولار اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم با قرائت جذب در طول موج ۲۶۵ نانومتر به مدت ۱ دقیقه محاسبه شد (۳۱).

با استفاده از محلول واکنش شامل بافر پتاسیم-فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH 7)، EDTA ۱ میلی‌مولار، گلوتاتیون اکسید شده ۱ میلی‌مولار، NADPH ۰/۲ میلی‌مولار و عصاره آنزیمی در حجم نهایی ۱ میلی‌مولار، فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز اندازه‌گیری شد. با خواندن میزان کاهش در جذب طول موج ۳۴۰ نانومتر به مدت ۱ دقیقه، فعالیت آنزیم محاسبه شد (۱۷).

فعالیت آنزیم گلوتاتیون S-ترانسفراز با قرائت میزان افزایش در جذب طول موج ۳۴۰ نانومتر به مدت یک دقیقه محاسبه شد که محلول واکنش شامل بافر Tris-HCl ۱۰۰ میلی‌مولار (pH 6.5)، گلوتاتیون ۱/۵ میلی‌مولار، ۱-کلرو ۲ و ۴-دی‌نیتروبنزن ۱ میلی‌مولار و عصاره آنزیمی در حجم نهایی ۷۰۰ میکرومولار بود (۲۰).

فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز بر اساس محلول واکنش شامل بافر پتاسیم-فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار (pH 7)، EDTA ۱ میلی‌مولار، سدیم‌آزید (NaN_3) ۱ میلی‌مولار، NADPH ۰/۱۲ میلی‌مولار، گلوتاتیون ۲ میلی‌مولار، ۱ واحد گلوتاتیون ردوکتاز، پراکسید هیدروژن ۰/۶ میلی‌مولار و عصاره آنزیمی اندازه‌گیری گردید. با اندازه‌گیری اکسیداسیون NADPH در طول موج ۳۴۰ نانومتر به مدت ۱ دقیقه فعالیت آنزیم محاسبه شد (۶).

فعالیت آنزیم کاتالاز براساس میزان کاهش در جذب ۲۴۰ نانومتر در یک دقیقه از تجزیه پراکسید هیدروژن محاسبه شد. محلول واکنش شامل بافر پتاسیم-فسفات ۵۰ میلی-مولار (pH 7)، پراکسید هیدروژن ۱۵ میلی‌مولار و عصاره آنزیمی در حجم نهایی ۷۰۰ میکرولیتر می‌باشد (۱۷).

فعالیت آنزیم گلی اکسالاز I با قرائت میزان افزایش در جذب طول موج ۲۴۰ نانومتر و محلول واکنش شامل بافر پتاسیم فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار (pH 7)، سولفات منیزیم ۱۵ میلی‌مولار، گلوتاتیون ۱/۷ میلی‌مولار، متیل گلی‌اکسال ۳/۵ میلی‌مولار در حجم نهایی ۷۰۰ میکرولیتر محاسبه گردید (۱۷).

فعالیت آنزیم گلی اکسالاز II با استفاده. محلول واکنش شامل بافر Tris-HCl ۱۰۰ میلی‌مولار (pH 7.2)، ۵،۵´-دی‌تیو بیس (۲-نیتروبنزوئیک اسید) (DTNB) ۰/۲ میلی-مولار و S-D-لاکتوگلوتاتیون در حجم نهایی ۱ میلی‌لیتر از اندازه‌گیری شد (۳۵).

تجزیه و تحلیل داده‌ها: تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS و مقایسه میانگین داده‌ها توسط آزمون حداقل تفاوت معنی‌داری (LSD) در سطح پنج درصد انجام شد و رسم نمودار با برنامه Excel صورت پذیرفت.

نتایج

تولید زیست‌توده و محتوای نسبی آب برگ: نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثر تیمار نیتروپروساید و آرسنیک بر روی وزن تر ریشه در سطح یک درصد معنی‌دار بوده است (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین نشان داد تیمار آرسنیک با غلظت ۵۰ میکرومولار باعث کاهش وزن تر ریشه به میزان ۱۱/۲ درصد نسبت به تیمار شاهد (بدون آرسنیک و نیتروپروساید) شد. در تمام سطوح آرسنیک، نیتروپروساید باعث افزایش وزن تر ریشه شد که بیشترین تاثیر افزایشی تحت غلظت ۱۰۰ میکرومولار مشاهده شد (جدول ۲). آنالیز واریانس داده‌ها نشان داد اثر تیمار آرسنیک و نیتروپروساید بر وزن تر اندام هوایی و وزن تر کل در سطح یک درصد و اثر متقابل تیمارها بر وزن تر اندام هوایی در سطح ۵ درصد و بر وزن تر کل در سطح یک درصد معنی-دار بود (جدول ۱). مقایسه میانگین تیمارها نشان داد هر دو غلظت آرسنیک باعث کاهش معنی‌دار وزن تر اندام هوایی نسبت به تیمار شاهد شد و درحالی که نیتروپروساید باعث بهبود وزن تر اندام هوایی تحت سمیت آرسنیک شد. تیمار آرسنیک همچنین باعث کاهش وزن تر کل گیاه شد به طوری که بیشترین میزان کاهش تحت غلظت ۵۰ میکرومولار مشاهده شد اما نیتروپروساید باعث افزایش وزن تر کل در تمام سطوح آرسنیک شد و بیشترین میزان وزن تر کل تحت تیمار آرسنیک ۲۵ میکرومولار + نیتروپروساید ۱۰۰ میکرومولار ثبت گردید (جدول ۲). تیمار آرسنیک، نیتروپروساید و اثر متقابل آنها بر محتوای نسبی آب برگ نیز در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). در گیاهان بدون تیمار آرسنیک، تیمار نیتروپروساید باعث کاهش محتوای نسبی آب برگ نسبت به شاهد شد. همچنین تیمار آرسنیک به ویژه در غلظت ۵۰ میکرومولار باعث کاهش معنی‌داری در محتوای نسبی آب برگ شد بطوریکه در غلظت ۵۰ میکرومولار آرسنیک محتوای نسبی آب برگ ۱۹ درصد کاهش نسبت به تیمار شاهد داشت. اما تحت تیمارهای ۲۵ و ۵۰ میکرومولار آرسنیک، استفاده از نیتروپروساید باعث بهبود محتوای نسبی آب برگ شد و که بیشترین افزایش تحت غلظت ۱۰۰ میکرومولار مشاهده شد (جدول ۲).

رنگیزه‌های فتوسنتزی، محتوای پرولین، مالون دی آلدئید و پراکسید هیدروژن: نتایج آنالیز واریانس نشان داد اثر آرسنیک، نیتروپروساید و اثر متقابل آنها بر محتوای کلروفیل a و b در سطح یک درصد معنی بود (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین نشان داد در هر دو کلروفیل a و b، افزایش غلظت آرسنیک باعث کاهش محتوای آنها شد و کمترین میزان کلروفیل a و b تحت غلظت ۵۰ میکرومولار آرسنیک مشاهده شد، با این حال تحت تیمار بدون

آرسنیک، نیتروپروساید باعث کاهش میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی نسبت به تیمار شاهد شد اما در غلظت ۲۵ میکرومولار آرسنیک، تیمار ۵۰ میکرومولار نیتروپروساید باعث افزایش و تحت غلظت ۵۰ میکرومولار آرسنیک، هر دو غلظت نیتروپروساید (۲۵ و ۵۰ میکرومولار) باعث افزایش و بهبود غلظت رنگیزه‌های کلروفیل نسبت به تیمار آرسنیک بدون نیتروپروساید شد (جدول ۲). نتایج مربوط به نسبت کلروفیل a/b نشان داد افزایش غلظت آرسنیک تاثیر معنی‌داری بر نسبت کلروفیلی نداشت اما استفاده از نیتروپروساید تحت تیمار بدون آرسنیک باعث کاهش، تحت تیمار ۲۵ میکرومولار آرسنیک باعث افزیش و تحت تیمار ۵۰ میکرومولار آرسنیک تاثیر معنی‌داری نداشت (جدول ۲).

جدول ۱- تجزیه واریانس تاثیر آرسنیک، نیتروپروساید و اثر متقابل آنها بر صفات مورفولوژی، محتوای نسبی آب، رنگیزه فتوسنتزی، پرولین، مالون دی آلدئید و پراکسید هیدروژن

	درجه آزادی	وزن تر ریشه	وزن تر اندام هوایی	وزن تر کل	محتوای نسبی آب	کلروفیل a	کلروفیل b	نسبت کلروفیل a/b	پرولین	مالون دی آلدئید	پراکسید هیدروژن
آرسنیک (A)	۲	۰/۰۲**	۰/۰۵**	۰/۱۱**	۵۰۰**	۰/۰۸**	۰/۰۴**	۰/۲*	۶۷**	۱۳۴۴**	۱۵۶**
نیتروپروساید (N)	۲	۰/۰۰۴**	۰/۰۰۵**	۰/۰۲**	۲۲**	۰/۰۲**	۰/۰۰۶**	۰/۰۷^{ns}	۱/۴**	۱۱۲**	۱۱**
A * N	۴	۰/۰۰۰۸^{ns}	۰/۰۰۳*	۰/۰۰۸**	۲۱**	۰/۰۴**	۰/۰۰۳*	۰/۲*	۰/۳۴*	۱۱۶**	۶**
خطای کل		۰/۰۰۰۴	۰/۰۰۰۹	۰/۰۰۱۲	۰/۷	۰/۰۰۲	۰/۰۰۰۹	۰/۰۶	۰/۰۸	۰/۹۶	۰/۱۷

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد، ns غیرمعنی‌دار

جدول ۲- اثر متقابل آرسنیک و نیتروپروساید بر صفات مورفولوژی، محتوای نسبی آب، رنگیزه فتوسنتزی، پرولین، مالون دی آلدئید و پراکسید هیدروژن

تیمار آرسنیک (میکرومولار)	تیمار نیتروپروساید (میکرومولار)	وزن تر ریشه (گرم بر بوته)	وزن تر اندام هوایی (گرم بر بوته)	وزن تر کل (گرم بر بوته)	محتوای نسبی آب (درصد)	کلروفیل a (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)	کلروفیل b (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)	نسبت کلروفیل a/b	پرولین (میکرومول بر گرم وزن تر)	مالون دی آلدئید (نانومول بر گرم وزن تر)	پراکسید هیدروژن (میکرومول بر گرم وزن تر)
۰	۰	۰/۸۲۳^{bc}	۱/۸۸^{ab}	۲/۷۰۵^{ab}	۹۶/۸۷^{a}	۰/۶۳۷^{a}	۰/۳۱۷^{ab}	۲/۰۱^{ab}	۳/۲۶^{f}	۲۱/۲۶^{h}	۵/۵۲^{fg}
	۵۰	۰/۸۳۲^{bc}	۱/۸۹۶^{a}	۲/۷۲۸^{a}	۹۷/۲۳^{a}	۰/۶۵^{a}	۰/۳۵۳^{a}	۱/۸۴^{ab}	۳/۶۲^{f}	۲۳/۲۳^{g}	۵/۱۹^{g}
	۱۰۰	۰/۸۳۴^{abc}	۱/۸۵۳^{ab}	۲/۶۸۷^{ab}	۹۴/۴^{cd}	۰/۳۸^{d}	۰/۲۸۳^{bc}	۱/۳۶^{c}	۴/۱۵^{e}	۲۶/۳۵^{f}	۵/۹^{f}
۲۵	۰	۰/۸۳۲^{bc}	۱/۸۳۲^{bc}	۲/۶۶۴^{b}	۹۳/۳۳^{d}	۰/۴۸۳^{bc}	۰/۲۴۷^{cd}	۱/۹۷^{ab}	۵/۸۱^{d}	۳۴/۶۶^{d}	۹/۶۳^{d}
	۵۰	۰/۸۵۷^{ab}	۱/۸۷۳^{ab}	۲/۷۳^{a}	۹۵/۴^{bc}	۰/۴۹۳^{b}	۰/۲۸۷^{bc}	۱/۷۴^{bc}	۶/۸۶^{c}	۳۰/۱۴^{e}	۸/۱۴^{e}
	۱۰۰	۰/۸۷^{a}	۱/۸۶۱^{ab}	۲/۷۳۱^{a}	۹۶/۵۷^{ab}	۰/۴۷۳^{bc}	۰/۲۱۳^{d}	۲/۲۴^{a}	۶/۷۵^{c}	۲۸/۶۶^{e}	۷/۵۹^{e}
۵۰	۰	۰/۷۳۱^{e}	۱/۶۸۳^{e}	۲/۴۱۵^{e}	۷۸/۳۷^{g}	۰/۲۹۳^{e}	۰/۱۴۳^{e}	۲/۰۵^{ab}	۸/۸۵^{b}	۵۸/۱^{a}	۱۶/۲۴^{a}
	۵۰	۰/۷۶۹^{d}	۱/۷۶۵^{d}	۲/۵۳۴^{d}	۸۳/۵۳^{f}	۰/۴۰۳^{d}	۰/۲۰۷^{d}	۱/۹۶^{ab}	۹/۶۴^{a}	۴۶/۱۴^{b}	۱۳/۹۹^{b}
	۱۰۰	۰/۸۰۹^{c}	۱/۷۸۷c^{d}	۲/۵۹۶^{c}	۸۶/۳۷^{e}	۰/۴۲۷^{cd}	۰/۲۱۷^{d}	۲/۰۱^{ab}	۸/۹۷^{b}	۳۸/۳۳^{c}	۱۱/۰۷^{c}

برای هر پارامتر در هر ستون، میانگین‌های دارای حروف مشترک براساس آزمون LSD در سطح پنج درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

نتایج آنالیز واریانس نشان داد اثر تیمار آرسنیک، نیتروپروساید و اثر متقابل آنها بر صفات پرولین، مالون دی آلدئید و پراکسید هیدروژن در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین نشان داد تحت تیمار آرسنیک، محتوای پرولین افزایش یافت که بیشترین میزان افزایش در غلظت ۵۰ میکرومولار مشاهده شد. همچنین تیمار نیتروپروساید باعث افزایش بیشتر پرولین شد به طوری که بیشترین میزان پرولین تحت تیمار آرسنیک ۵۰ میکرومولار + نیتروپروساید ۵۰ میکرومولار مشاهده شد (جدول ۲). تیمار آرسنیک باعث افزایش تولید مالون دی آلدئید شد به طوری که تحت غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میکرومولار آرسنیک به ترتیب به میزان ۶۳ و ۱۷۳درصد نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت. اما استفاده از نیتروپروساید باعث کاهش محتوای مالون دی آلدئید در تمام سطوح آرسنیک شد (جدول ۲). محتوای پراکسید هیدروژن که نشان دهنده میزان تنش اکسیداتیو در گیاه می‌باشد، با افزایش غلظت آرسنیک افزایش معنی‌داری نسبت به گیاهان شاهد داشتند با این حال تیمار نیتروپروساید باعث کاهش محتوای پراکسید هیدروژن شد که غلظت ۱۰۰ میکرومولار تاثیر بیشتری در میزان کاهش پراکسید هیدروژن نسبت به غلظت ۵۰ میکرومولار داشت (جدول ۲).

محتوای آسکوربیک اسید، گلوتاتیون احیا شده، گلوتاتیون اکسید شده و نسبت گلوتاتیون احیا شده به اکسید شده: نتایج آنالیز واریانس نشان داد اثر تیمار آرسنیک و نیتروپروساید بر غلظت آسکوربیک اسید، گلوتاتیون احیا شده و اکسید شده و همچنین نسبت گلوتاتیون احیا شده به اکسید شده در سطح یک درصد و اثر متقابل تیمارها بر صفات آسکوربیک اسید و گلوتاتیون اکسید شده در سطح یک درصد و بر گلوتاتیون احیا شده و نسبت گلوتاتیون احیا شده به اکسید شده در سطح ۵ درصد معنی‌دار داشت (جدول ۳). مقایسه میانگین نشان داد افزایش غلظت آرسنیک باعث کاهش غلظت آسکوربیک اسید نسبت به تیمار شاهد شد و تیمار نیتروپروساید باعث بهبود و افزایش آسکوربیک اسید در تمام سطوح آرسنیک شد (شکل ۱ الف). گلوتاتیون احیا شده با افزایش غلظت آرسنیک افزایش معنی‌داری نسبت به گیاه شاهد پیدا کرد به طوریکه بیشترین میزان گلوتاتیون احیا شده تحت غلظت ۵۰ میکرومولار آرسنیک مشاهده شد. نیتروپروساید در تمام سطوح غلظت آرسنیک باعث افزایش بیشتز گلوتاتیون شد که بیشترین تاثیر تحت غلظت ۱۰۰ میکرومولار نیتروپروساید مشاهده گردید (شکل ۱ ب). افزایش غلظت آرسنیک باعث افزایش محتوای گلوتاتیون اکسید شده شد که تیمار ۲۵ و ۵۰ میکرومولار باعث افزایش گلوتاتیون اکسید شده به ترتیب به میزان ۶۹ و ۱۳۸ درصد نسبت به تیمار شاهد شد. نیتروپروساید در تیمار بدون آرسنیک باعث افزایش اما در سطوح ۲۵ و ۵۰ میکرومولار آرسنیک باعث کاهش محتوای گلوتاتیون اکسید شده شد (شکل ۱ پ). غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میکرومولار آرسنیک به ترتیب باعث کاهش نسبت گلوتاتیون احیا شده به اکسید شده به میزان ۸/۹ و ۲۰/۶ درصد نسبت به گیاه شاهد شد درحالی که تیمار نیتروپروساید باعث بهبود نسبت گلوتاتیونی در هر دو غلظت آرسنیک شد که غلظت ۱۰۰ میکرومولار نیتروپروساید تاثیر بیشتری نسبت به غلظت ۵۰ میکرومولار داشت (شکل ۱ ت).

فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان: اثر تیمار آرسنیک و اثر متقابل آنها در سطح یک درصد و اثر تیمار نیتروپروساید در سطح پنج درصد بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز معنی‌دار بود (جدول ۴). تجزیه واریانس نشان داد اثر تیمار آرسنیک، نیتروپروساید و اثر متقابل آنها بر فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون ردوکتاز، گلوتاتیون S–ترانسفراز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز درسطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۴).

جدول ۳- تجزیه واریانس تاثیر آرسنیک، نیتروپروساید و اثر متقابل آنها بر محتوای آسکوربیک اسید و گلوتاتیون

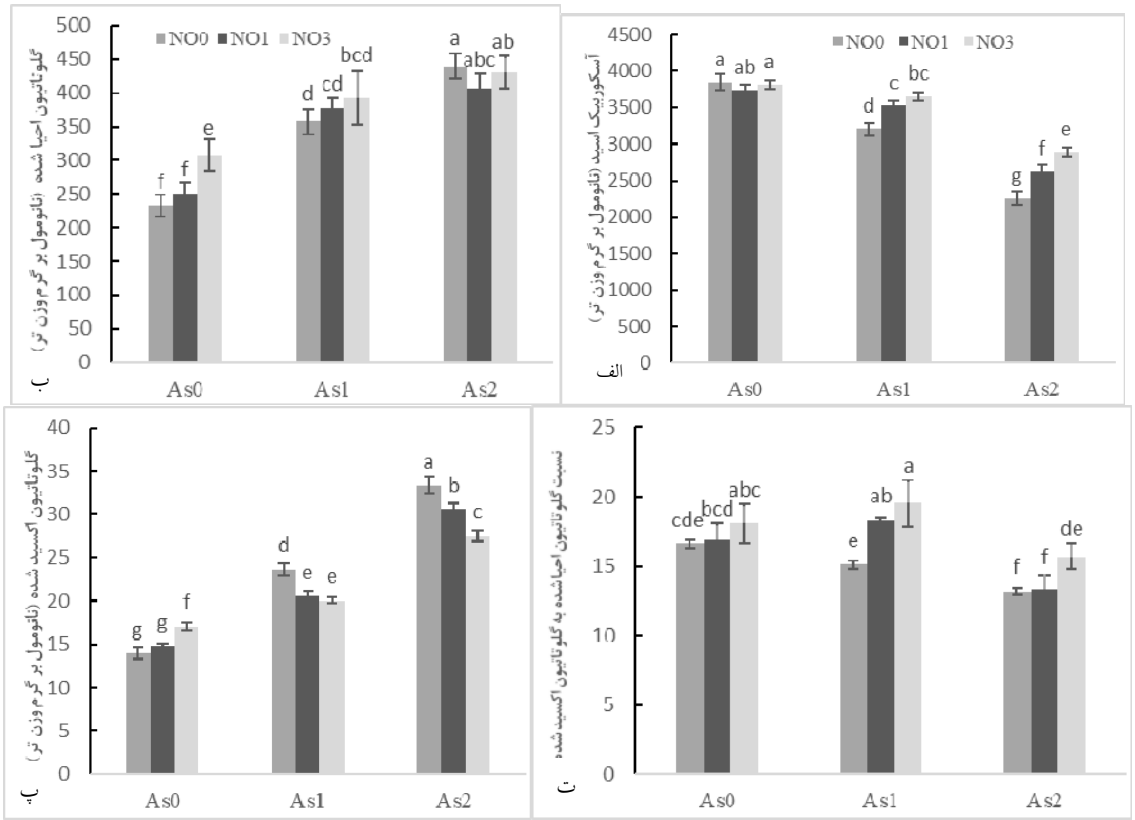
	درجه آزادی	آسکوربیک اسید	گلوتاتیون احیا شده	گلوتاتیون اکسید شده	نسبت گلوتاتیون احیا شده به اکسید شده
آرسنیک (A)	۲	۳۵۱۲۹۵۰**	۶۲۳۴۸**	۵۲۶**	۳۴**
نیتروپروساید (N)	۲	۲۷۹۵۱۵**	۳۳۵۰**	۱۱**	۱۷**
A * N	۴	۱۰۱۰۵۷**	۱۵۵۲*	۱۶/۷**	۳*
خطای کل		۷۰۰۷	۵۱۷	۰/۴	۰/۹

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد، ns غیرمعنی‌دار

جدول ۴- تجزیه واریانس تاثیر آرسنیک، نیتروپروساید و اثر متقابل آنها بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان

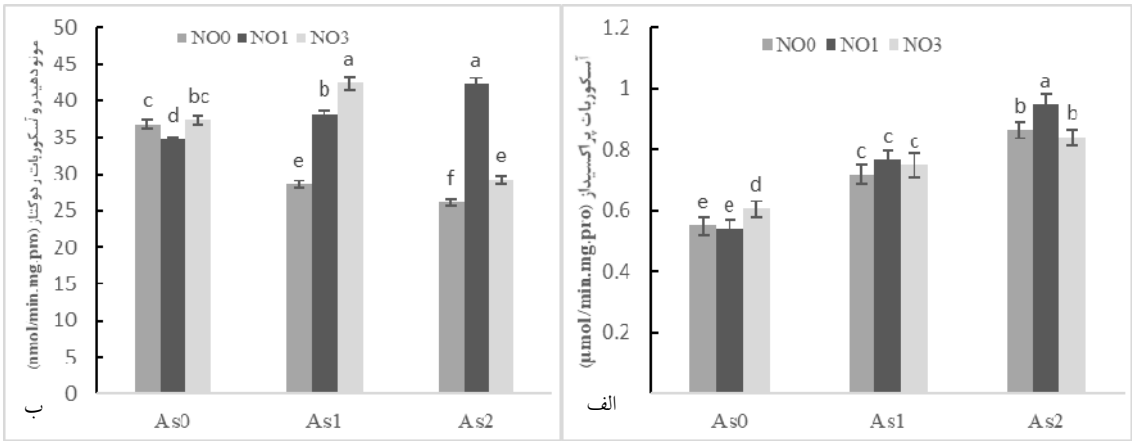
	درجه آزادی	آسکوربات پراکسیداز	مونودهیدرو آسکوربات ردوکتاز	دهیدروآسکوربات ردوکتاز	گلوتاتیون ردوکتاز	گلوتاتیون S-ترانسفراز	گلوتاتیون پراکسیداز	کاتالاز	گلی‌اکسالاز I	گلی‌اکسالاز II
نیتروپروساید (N)	۲	۰/۰۰۴*	۱۵۰**	۱۴۵۷**	۱۰۶**	۴۲۴**	۰/۰۰۲**	۵۱۵**	۰/۰۰۵**	۰/۰۰۲**
آرسنیک (A)	۲	۰/۲**	۴۴**	۳۱۰**	۲۱۰**	۲۳۷۳**	۰/۰۰۰۵**	۷۹**	۰/۰۰۰۳**	۰/۰۰۲**
N * A	۴	۰/۰۰۶**	۱۱۲**	۱۳۹۱**	۵۲**	۱۱۸**	۰/۰۰۰۸**	۷۱**	۰/۰۰۳**	۰/۰۰۰۸**
خطای کل		۰/۰۰۱	۰/۴	۱/۴	۰/۵	۱/۹	۰/۰۰۰۰۳	۱/۱	۰/۰۰۰۰۲	۰/۰۰۰۰۲

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد، ns غیرمعنی‌دار



شکل ۱- اثر نیتروپروساید (NO0: ۰، NO1: ۵۰ و NO2: ۱۰۰ میکرومولار) بر محتوای آسکوربیک اسید (الف)، گلوتاتیون احیا شده (ب)، گلوتاتیون اکسید شده (پ) و نسبت گلوتاتیون احیا شده به اکسید شده (ت) در سطوح مختلف آرسنیک (As0: ۰، As1: ۲۵ و As2: ۵۰ میکرومولار). میانگین‌های دارای حروف مشترک براساس آزمون LSD در سطح پنج درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

نتایج مقایسه میانگین نشان داد افزایش غلظت آرسنیک باعث افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز نسبت به تیمار شاهد شد و بیشترین میزان فعالیت تحت غلظت ۵۰ میکرومولار آرسنیک مشاهده شد. نیتروپروساید تاثیر معنی‌داری تحت غلظت ۲۵ میکرومولار آرسنیک نداشت اما غلظت ۵۰ میکرومولار نیتروپروساید تحت غلظت ۵۰ میکرومولار آرسنیک باعث افزایش بیشتر فعالیت آنزیم شد و در دیگر غلظت تاثیر معنی‌داری نداشت (شکل ۲ الف). اثر تیمار آرسنیک، نیتروپروساید و اثر متقابل آنها بر فعالیت دو آنزیم مونودهیدرو آسکوربات ردوکتاز و دهیدروآسکوربات ردوکتاز در سطح پنج درصد تاثیر معنی‌داری داشت (جدول ۴). اعمال تیمار آرسنیک در دو غلظت ۲۵ و ۵۰ میکرومولار باعث کاهش فعالیت هر دو آنزیم مونودهیدرو آسکوربات ردوکتاز و دهیدروآسکوربات ردوکتاز نسبت به تیمار شاهد شد و بیشترین کاهش تحت غلظت ۵۰ میکرومولار مشاهده شد، اما تیمار نیتروپروساید باعث افزایش فعالیت این دو آنزیم در تمام سطوح آرسنیک شد که تحت غلظت ۲۵ میکرومولار آرسنیک تیمار ۱۰۰ میکرومولار و تحت غلظت ۵۰ میکرومولار آرسنیک تیمار ۵۰ میکرومولا نیتروپروساید بیشترین تاثیر را داشت (شکل ۲ ب و ۳ الف).



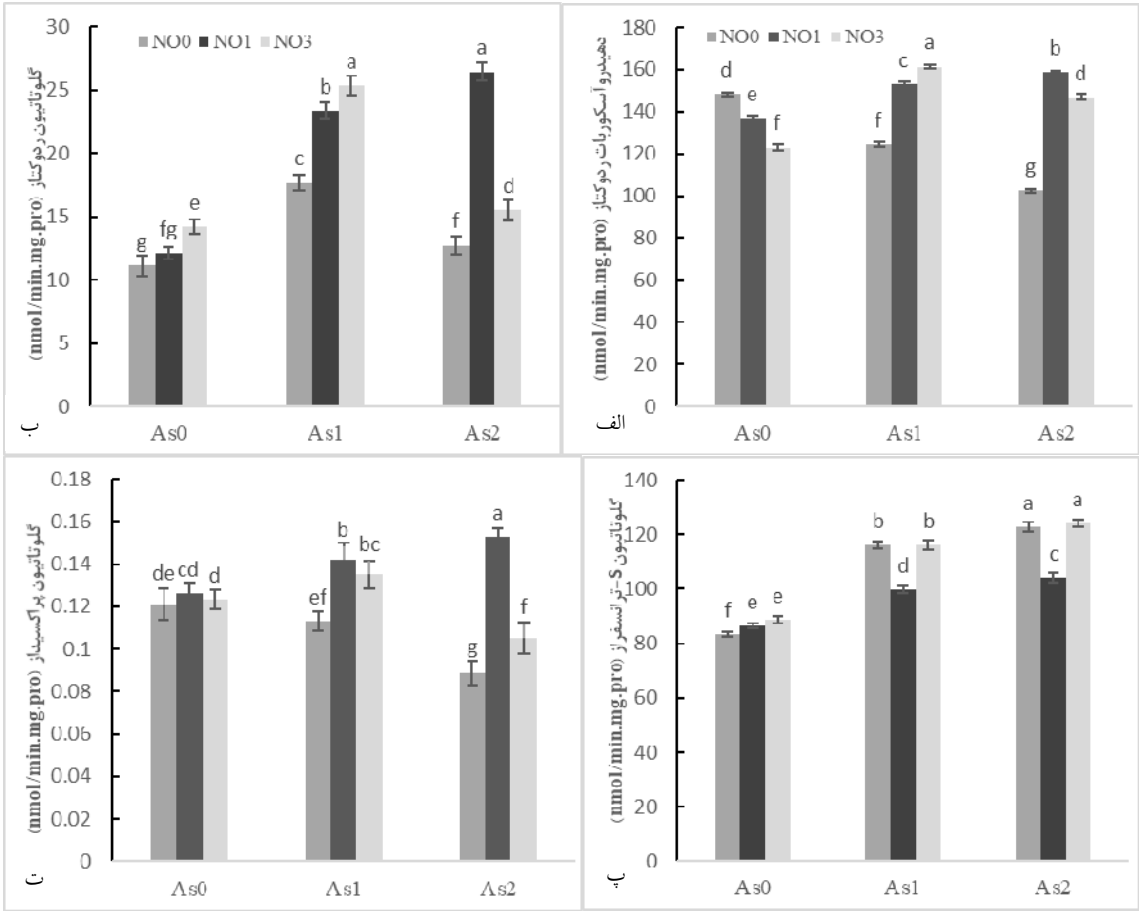
شکل ۲- اثر نیتروپروساید (NO0: ۰، NO1: ۵۰ و NO2: ۱۰۰ میکرومولار) بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (الف) و آنزیم مونودهیدرو آسکوربات ردوکتاز (ب) در سطوح مختلف آرسنیک (As0: ۰، As1: ۲۵ و As2: ۵۰ میکرومولار). میانگین‌های دارای حروف مشترک براساس آزمون LSD در سطح پنج درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

تیمار آرسنیک باعث افزایش فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز نسبت به تیمار شاهد شد بطوریکه بیشترین افزایش تحت غلظت ۲۵ میکرومولار آرسنیک مشاهده شد. استفاده از نیتروپروساید نیز باعث افزایش بیشتر فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز در تمام سطوح آرسنیک شد (شکل ۳ ب). فعالیت آنزیم گلوتاتیون S-ترانسفراز با افزایش غلظت آرسنیک روند افزایشی نشان داد که بیشترین فعالیت تحت غلظت ۵۰ میکرومولار آرسنیک مشاهده شد و تیمار نیتروپروساید در غلظت ۵۰ میکرومولار باعث کاهش فعالیت آنزیم شد درحالیکه غلظت ۱۰۰ میکرومولار تاثیر معنی‌داری در فعالیت آنزیم گلوتاتیون S-ترانسفراز نداشت (شکل ۳ پ). فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز نیز با اعمال تیمار آرسنیک کاهش یافتند که افزایش غلظت آرسنیک باعث کاهش بیشتر فعالیت آن شد. با این حال، تیمار نیتروپروساید باعث افزایش فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در سطوح

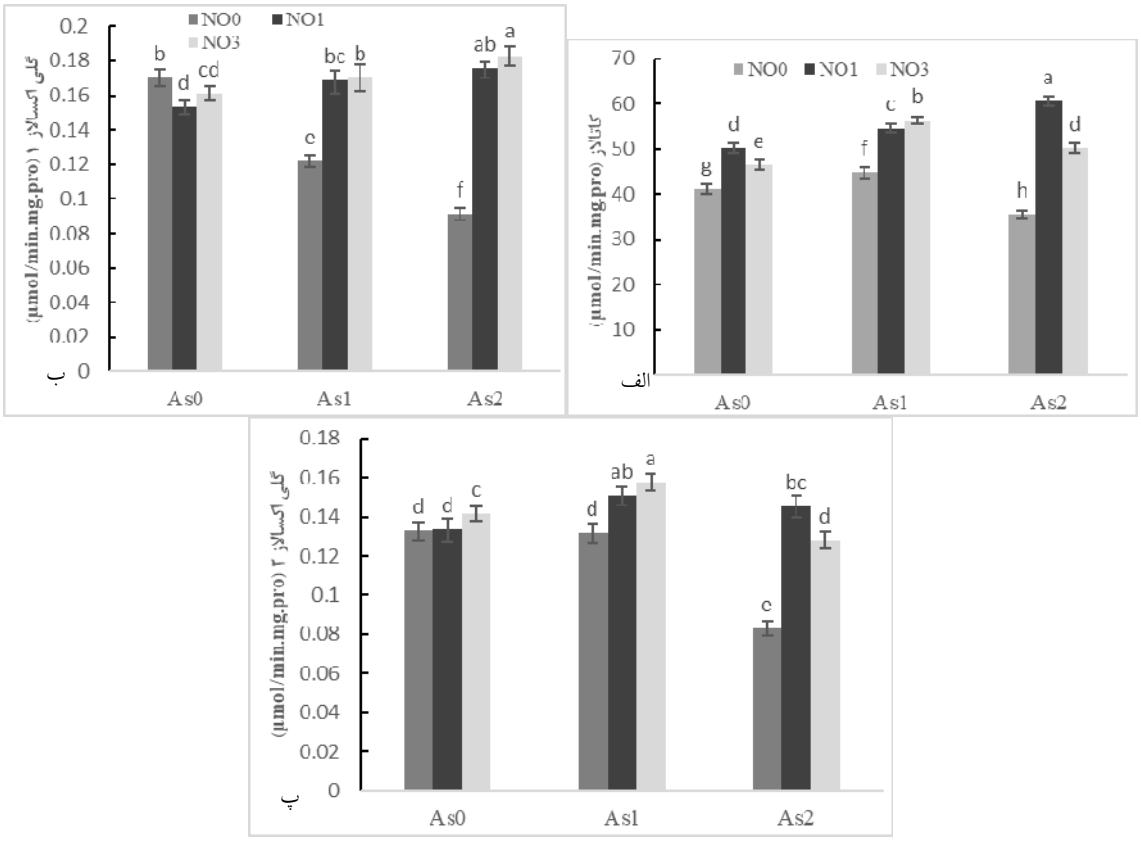
مختلف آرسنیک شد که بیشترین افزایش در غلظت ۵۰ میکرومولار نیتروپروساید مشاهده شد (شکل ۳ ت). غلظت ۲۵ میکرومولار آرسنیک باعث افزایش فعالیت کاتالاز به میزان ۸/۶ درصد و غلظت ۵۰ میکرومولار آرسنیک باعث کاهش فعالیت کاتالاز به میزان ۱۳/۸ درصد نسبت به تیمار شاهد شد. درحالیکه نیتروپروساید در تمام سطوح آرسنیک باعث بهبود و افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز شد (شکل ۴ الف).

بحث و نتیجه گیری

همان طور که گزارش شده بود، افزایش تجمع آرسنیک خاک، حتی در غلظت کم، بر روی رشد و عملکرد گیاه گندم تاثیر می‌گذارد (۱۵). تیمار آرسنیک به خصوص در غلظت ۵۰ میکرومولار باعث کاهش وزن تر ریشه و اندام هوایی و همچنین وزن تر کل گیاه نسبت به گیاه شاهد شد که مطابق نتایج به دست آمده از تاثیر آرسنیک بر گیاه کاهوی آبی (*Pistia stratiotes*) (۷) و گیاه لادن (۳۲) می-باشد.



شکل ۳- اثر نیتروپروساید (NO0: ۰، NO1: ۵۰ و NO2: ۱۰۰ میکرومولار) بر فعالیت آنزیم دهیدروآسکوربات ردوکتاز (الف)، آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز (ب)، گلوتاتیون S-ترانسفراز (پ) و گلوتاتیون پراکسیداز (ت) در سطوح مختلف آرسنیک (As0: ۰، As1: ۲۵ و As2: ۵۰ میکرومولار). میانگین‌های دارای حروف مشترک براساس آزمون LSD در سطح پنج درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.



شکل ۴- اثر نیتروپروساید (NO0: ۰، NO1: ۵۰ و NO2: ۱۰۰ میکرومولار) بر فعالیت آنزیم کاتالاز (الف)، آنزیم گلی اکسالاز I (ب) و گلی اکسالاز II (پ) در سطوح مختلف آرسنیک (As0: ۰، As1: ۲۵ و As2: ۵۰ میکرومولار). میانگین‌های دارای حروف مشترک براساس آزمون LSD در سطح پنج درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

افزایش تجمع آرسنیک با افزایش تولید انواع رادیکال‌های آزاد، باعث برهم زدن تعادل پتانسیل ردوکس سلولی و افزایش ظرفیت اکسیداسیون سلول می‌شود که به طور منفی بر روی چندین فرآیند فیزیولوژیکی گیاه تاثیر گذاشته و حتی باعث مرگ گیاه می‌شود (۴۲). اثرات سمی آرسنیک در حضور یک ترکیب آزاد کننده NO کاهش می‌یابد که می‌تواند به خاطر افزایش ظرفیت آنتی اکسیدان گیاه باشد. در حقیقت، NO به عنوان یک پیامبر سلولی با فعال‌سازی سیستم‌های آنتی اکسیدان در سلول‌ها و همچنین به عنوان یک آنتی اکسیدان با حذف مستقیم رادیکال‌های آزاد سلولی عمل می‌کند که می‌تواند باعث بهبود تحمل گیاه تحت سمیت آرسنیک شود (۴۲، ۴۶).

محتوای نسبی آب گیاه به عنوان یک فاکتور کارآمد برای ارزیابی تحمل گیاه به تنش اسمزی حاصل از سمیت آرسنیک مورد بررسی قرار گرفت. نتایج ما نشان داد آرسنیک به خصوص در غلظت ۵۰ میکرومولار منجر کاهش چشمگیر محتوای نسبی آب برگ گیاه گندم شد که نتایج مشابهی بر روی گیاه لوبیا گزارش شده است (۴۳). با اینحال، نیتروپروساید تا اندازه‌ای باعث بهبود محتوای نسبی آب برگ تحت سطوح مختلف آرسنیک شد که مطابق نتایج بدست آمده در مطالعات قبلی می‌باشد (۲۶). محتوای کلروفیل برگ یک فاکتور مهم می‌باشد که نشان دهنده میزان فتوسنتز در گیاهان می‌باشد و یکی از مهمترین معیارهای سلامت گیاه می‌باشند (۱۲). یکی از مهمترین اثرات فلزات سمی بر گیاهان، کاهش رنگیزه‌های فتوسنتزی

برگ می‌باشد (۱۰). نتایج نشان داد که محتوای کلروفیل برگ تحت سمیت آرسنیک کاهش معنی‌داری یافت که این کاهش می‌تواند دلایل مختلفی از جمله پراکسیداسیون غشاهای کلروپلاست، افزایش فعالیت کلروفیلاز و میان-کنش فلز سنگین با گروه سولفید (SH-) آنزیم‌های درگیر در سنتز کلروفیل داشته باشد (۴۴). با این حال، گزارش شده است که NO توانایی کاهش این اثرات تحت شرایط تنش‌زا از جمله فلزات سنگین را دارد (۴۰) که مطابق نتایج به دست آمده در این تحقیق می‌باشد. در گزارش دیگری بیان شد که اثرات کلروزه شدن فلزات سنگین توسط ترکیبات آزاد کننده NO کاهش می‌یابد (۲۱). نتایج این تحقیق همچنین نشان داد محتوای پرولین تحت سمیت آرسنیک افزایش یافت و نیتروپروساید باعث افزایش بیشتر پرولین در گیاهچه‌های گندم شد. این نتایج بیان می‌کند که کاربرد نیتروپروساید باعث افزایش تولید پرولین و کاهش تنش اکسیداتیو شد که در نتیجه باعث بهبود تحمل گیاهچه‌های گندم به سمیت آرسنیک می‌شود. گزارش شده است که نیتروپروساید (به عنوان آزاد کننده NO) با افزایش بیان آنزیم سنتزکننده پرولین (P5CS) باعث افزایش تجمع پرولین تحت تنش در گیاه گندم می‌شود (۲۷). نتایج مشابهی از افزایش محتوای پرولین تحت تیمار نیتروپروساید قبلا گزارش شده است (۹، ۴۷).

مشابه دیگر تنش‌های محیطی، غلظت‌های سمی آرسنیک نیز باعث افزایش تولید انوع اکسیژن فعال در گیاه می‌شود (۱۴). در این تحقیق، افزایش غلظت آرسنیک باعث افزایش محتوای مالون دی آلدئید شد که می‌تواند به علت افزایش در فعالیت آنزیم‌های مسئول در تجزیه پراکسیدهای لیپید باشد. افزایش در محتوای مالون دی آلدئید توسط محققان دیگری نیز گزارش شده است (۴۱، ۴۲). آرسنیک همچنین باعث افزایش محتوای پراکسید هیدروژن شد. افزایش تولید مالون دی آلدئید و پراکسید هیدروژن نشان دهنده سیستم دفاعی ناکارآمد از آنزیم‌های آنتی اکسیدان می‌باشد. با این حال، استفاده از نیتروپروساید باعث کاهش قابل توجه‌ای در محتوای مالون دی آلدئید و پراکسید هیدروژن در مقایسه با تیمارهای آرسنیک بدون نیتروپروساید شد. این کاهش محتوای مالون دی آلدئید و نیتروپروساید می‌تواند ناشی از فعالیت پایدار بالای آنزیم-های آنتی اکسیدان خنثی‌کننده رادیکال‌های آزاد در گیاهچه‌های گندم تیمار شده با نیتروپروساید باشد. بیان شده است که که NO یک مهارکننده قوی پراکسیداسیون لیپید می‌باشد (۳۶). همچنین گزارش شده است که NO به صورت غیر مستقیم باعث خنثی‌سازی انواع رادیکال‌های آزاد می‌شود و با تعدیل فرآیندهای مختلف فیزیولوژیکی، باعث کاهش آسیب اکسیداتیو و در نتیجه محافظت از مرگ سلول‌های گیاهی می‌شود (۱۷، ۲۳). این نتایج مطابق نتایج به دست آمده از این مطالعه می‌باشد که افزایش غلظت نیتروپروساید باعث کاهش محتوای پراکسیدهیدروژن شد. نتایج مشابه از نقش محافظتی NO در کاهش تنش اکسیداتیو حاصل از آرسنیک یا دیگر فلزات سنگین توسط محقیق دیگری گزارش شده است (۲۵، ۴۱، ۴۲).

چرخه آسکوربیک اسید-گلوتاتیون نقش کلیدی در متابولیسم پراکسیدهیدروژن در گیاهان دارد. آسکوربیک اسید، به عنوان یک آنتی اکسیدان اولیه در گیاهان، به طور مستقیم باعث احیا و خنثی‌سازی رادیکال هیدروکسیل، اکسیژن منفرد و سوپراکسید می‌شود (۸). نتایج ما اثبات کرد که محتوای آسکوربیک اسید با افزایش سطح غلظت آرسنیک، کاهش یافت که این کاهش عمدتاً به خاطر کاهش فعالیت مونودهیدروآسکوربات ردوکتاز یا افزایش فعالیت آسکوربات پراکسیداز می‌باشد. کاهش محتوای آسکوربیک اسید در گیاهان تحت تنش فلزات سنگین توسط محقیقن دیگر گزارش شده است (۲۴). با این حال، استفاده از نیتروپروساید باعث افزایش محتوای آسکوربیک اسید نسبت به تیمار آرسنیک بدون نیتروپروساید شد. اگرچه فعالیت آسکوربیک پراکسیداز در گیاهان تیمار شده با نیتروپروساید بالاتر بود، افزایش فعالیت آنزیم‌های

مونودهیدروآسکوربات ردوکتاز و دهیدروآسکوربات ردوکتاز به طور موثری باعث بازیافت و افزایش سطح آسکوربیک اسید شد. این نتایج نشان می‌دهد NO نقش مهمی در احیای آسکوربیک اسید ایفا می‌کند که مطابق گزارشات قبلی می‌باشد (۱۴).

گزارش شده است که تحت سمیت فلزات سنگین، گلوتاتیون عملکرد سیگنالیگ دارد (۳۹). نتایج پژوهش حاضر نشان داد تیمار آرسنیک باعث افزایش معنی‌دار در محتوای گلوتاتیون احیا شده و گلوتاتیون اکسید شده شد درحالی که، نسبت گلوتاتیون احیا شده به اکسید شده کاهش پیدا کرد. افزایش در محتوای گلوتاتیون احیا شده تحت سمیت آرسنیک می‌تواند ناشی از تنظیم افزایشی فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز باشد که مطابق نتایج قبلا گزارش شده می‌باشد (۲۹). تشکیل گلوتاتیون اکسید شده در گیاهان تحت تیمار آرسنیک ممکن است ناشی از واکنش گلوتاتیون با رادیکال‌های آزاد تولید شده توسط تنش اکسیداتیو و یا ناشی از افزایش فعالیت آنزیم گلوتاتیون S–ترانسفراز باشد که پراکسید و هیدروپراکسیدهای آلی را تجزیه می‌کند. افزایش در گلوتاتیون اکسید شده تحت تنش فلز سنگین در گیاه لوبیا (۱) و برنج (۲۹) گزارش شده است. تیمار نیتروپروساید باعث افزایش گلوتاتیون احیا شده و کاهش گلوتاتیون اکسید شده در گیاهان گندم تحت تیمار آرسنیک شد که نشان دهنده آن است که NO می‌تواند باعث افزایش سنتز گلوتاتیون شود (۲۳). علاوه بر این، تیمار نیتروپروساید باعث حفظ سطح پایین گلوتاتیون اکسید شده از طریق افزایش فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز و در نتیجه کاهش سمیت شد. نتایج نشان داد NO باعث نسبت بالاتری از گلوتاتیون احیا شده به گلوتاتیون اکسید شده تحت سمیت آرسنیک شد که نقش NO در تنظیم حالت ردوکس سلول گیاهی را نشان می‌دهد.

چرخه آسکوربیک اسید–گلوتاتیون باعث کاهش تجمع پراکسید هیدروژن می‌شود، جایی که آسکوربات پراکسیداز باعث احیای آن به آب می‌شود. افزایش غلظت آرسنیک تا اندازه‌ای باعث افزایش فعالیت آسکوربات پراکسیداز شد که مشابه نتایج محققان دیگر می‌باشد (۱، ۴۱). با این حال، تیمار نیتروپروساید تغییر چندانی در فعالیت این آنزیم ایجاد نکرد. مونودهیدرو آسکوربات ردوکتاز و دهیدرور آسکوربات ردوکتاز دو آنزیم مهم در بازسازی آسکوربیک اسید هستند که برای حفظ ظرفیت آنتی اکسیداتیوی آسکوربیک اسید ضروری هستند. مطابق مطالعات قبلا گزارش شده (۲۹)، فعالیت دو آنزیم مونودهیدرو آسکوربات ردوکتاز و دهیدروآسکوربات ردوکتاز تحت سمیت آرسنیک کاهش یافتند، درحالی که تیمار نیتروپروساید باعث بهبود فعالیت این دو آنزیم تحت سمیت آرسنیک شد. گلوتاتیون ردوکتاز آنزیمی مهم در چرخه آسکوربیک اسید–گلوتاتیون می‌باشد که باعث حفظ حالت احیا شده گلوتاتیون می‌شود و نقش مهمی را در حفظ گروه سولفیدریل (SH-) ایفا می‌کند و به عنوان سوبسترا برای گلوتاتیون S–ردوکتاز عمل می‌کند (۴۹). نتایج ما نشان داد فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز در گیاهچه‌های گندم تحت تیمار آرسنیک افزایش معنی‌داری یافتند که مطابق نتایج محققان دیگر است (۲۹).

گلوتاتیون S–ترانسفراز اتصال الکتروفیل‌های مختلف به گلوتاتیون و همچنین خنثی‌سازی ترکیبات سمی داخلی و خارجی را کاتالاز می‌کند (۴). مطالعات انجام شده بر روی گیاه گندم (۱۵) نشان داد که فعالیت آنزیم گلوتاتیون S–ترانسفراز در پاسخ به فلزات سنگین افزایش یافته بود که مطابق نتایج به دست آمده در این تحقیق می‌باشد که هر دو غلظت آرسنیک باعث افزایش فعالیت این آنزیم شد. با این حال، تیمار نیتروپروساید تاثیر چندانی بر فعالیت این آنزیم نداشت. آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز یک خانواده از ایزوزیم‌های آنزیمی هستند از گلوتاتیون برای احیای پراکسیدهای مختلف شامل پراکسید هیدروژن استفاده می‌کنند. در این تحقیق، کاهش معنی‌داری در فعالیت آنزیم

گلوتاتیون پراکسیداز تحت غلظت‌های مختلف آرسنیک مشاهده شده است، با این حال، تیمار نیتروپروساید باعث افزایش بیشتر این آنزیم در مقایسه با تیمارهای آرسنیک به تنهایی شد. نتایج مشابهی از افزایش فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز بعد از تیمار نیتروپروساید تحت سمیت فلزات سنگین گزارش شده است (۲۵). مطالعات مختلف از بررسی پاسخ گیاهان مختلف به تنش‌های محیطی نشان داد آنزیم کاتالاز یکی از مهمترین و کارآمدترین آنزیم خنثی‌سازی پراکسید هیدروژن می‌باشد (۱۱). نتایج ما نشان داد تیمار آرسنیک تاثیر چندانی بر فعالیت آنزیم کاتالاز نداشت حتی غلظت ۵۰ میکرومولار باعث کاهش فعالیت کاتالاز شد که نشان می‌دهد آنزیم کاتالاز نقش چندانی در کاهش پراکسید هیدروژن تحت سمیت آرسنیک نداشت که ممکن است به خاطر سنتز غیر موثر آنزیم یا تغییر در جمع شدن زیرواحدهای آنزیم باشد (۱۳). در مقابل، تیمار نیتروپروساید تحت غلظت‌های مختلف آرسنیک باعث افزایش فعالیت کاتالاز شد که نشان دهنده نقش موثر نیتروپروساید در خنثی‌سازی پراکسید هیدروژن تحت سمیت آرسنیک می‌باشد.

سیستم گلی اکسالاز شامل دو آنزیم گلی اکسالاز I و II می‌باشد که باعث تبدیل متیل گلی اکسال به اسیدهای هیدروکسی غیر سمی مانند لاکتات می‌شود (۳۳، ۴۸). در چندین گونه گیاهی افزایش بیان ژن این آنزیم‌ها باعث افزایش تحمل گیاه به تنش‌های غیرزیستی شده است (۳۷). نتایج این تحقیق نشان داد تیمار آرسنیک باعث کاهش شدید فعالیت آنزیم گلی اکسالاز I شد در حالی که فعالیت آنزیم گلی اکسالاز II فقط تحت غلظت ۵۰ میکرومولار آرسنیک کاهش یافت. این تغییرات در فعالیت آنزیم‌های مسیر اکسالاز نشان داد که سمیت زدایی متیل اکسال توسط سیستم گلی اکسالاز تحت تنش آرسنیک کارآمد نبوده است. در مقابل، فعالیت آنزیم‌های گلی اکسلاز I و II در تمام سطوح آرسنیک با استفاده از نیتروپروساید افزایش یافتند که نشان دهنده سمیت زدایی کارآمد متیل اکسال در گیاهان تحت تیمار نیتروپروساید می‌باشد. نتایج مشابهی از تاثیر نیتروپروساید و فلزات سنگین بر فعالیت آنزیم سیستم گلی اکسالاز توسط محققین دیگر گزارش شده بود (۱۴).

نتایج کلی ما در این تحقیق نشان داد که افزایش غلظت آرسنیک باعث ایجاد تنش اکسیداتیو درگیاهچه‌های گندم شد که با افزایش محتوای مالون دی آلدئید و پراکسید هیدروژن همراه با ممانعت یا القای ناکارآمد آنتی‌اکسیدان-های آنزیمی و غیرآنزیمی و سیستم‌های خنثی‌سازی متیل اکسال نشان داده شد. با این حال، تیمار نیتروپروساید به عنوان یک ترکیب آزاد کننده NO، به طور چشمگیری باعث بهبود محتوای نسبی آب، رنگیزه‌های فتوسنتزی و پرولین شد. نیتروپروساید همچنین باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و آنتی اکسیدان‌های غیرآنزیمی شد که در نهایت باعث کاهش تنش اکسیداتیو (کاهش سطح پراکسید هیدروژن و مالون دی آلدئید) شد. علاوه بر این، نیتروپروساید باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های گلی اکسالاز و در نتیجه کاهش سطح ترکیب سمی متیل اکسال تحت سطوح مختلف آرسنیک و افزایش تحمل گیاه به تنش آرسنیک شد.

منابع

1- Anjum, N. A., S. Umar, M. Iqbal, and N. A. Khan, 2011. Cadmium causes oxidative stress in mung bean by affecting the antioxidant enzyme system and ascorbate–glutathione cycle metabolism. Russ. J. Plant Physiol. 58: 92–99.

2- Arnon, D. T. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenaloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol. 24: 1–15

3- Bates, L. S., R. P. Waldren, and I. D. Teare, 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil 39: 205–207.

4- Chronopoulou, E. G., and N. E. Labrou, 2009. Glutathione transferases: emerging multidisciplinary tools in red and green biotechnology. Recent Pat. Biotechnol. 3: 211–223

5- Corpas, F. J., M. Leterrier, R. Valderrama, M. Airaki, M. Chaki, J. M. Palma, and J. B. Barroso, 2011. Nitric oxide imbalance provokes a nitrosative response in plants under abiotic stress. Plant Sci. 181: 604–611.

6- Elia, A. C., R. Galarini, M. I. Taticchi, A. J. M. Dorr, and L. Mantilacci, 2003. Antioxidant responses and bioaccumulation in *Ictalurus melas* under mercury exposure. Ecotoxicol. Environ. Saf. 55: 162–167.

7- Farnese, F. S., J. A. Oliveira, G. S. Gusman, G. A. Leao, N. M. Silveira, P. M. Silva, C. Ribeiro, J. Cambraia, 2013. Effects of adding nitroprusside on arsenic stressed response of *Pistia stratiotes* L. under hydroponic conditions. Int. J. Phytoremediation 16: 123–137.

8- Foyer, C. H. 2003. Ascorbate and glutathione metabolism in plants: H2O2-processing and signaling. In: Gitler C, Danon A (eds) Cellular implications of redox signaling. Imperial College Press, London, pp 191–212

9- Gao, H. J., H. Q. Yang, and J. X. Wang, 2009. Arginine metabolism in roots and leaves of apple (*Malus domestica* Borkh.): the tissue-specific formation of both nitric oxide and polyamines. Sci. Hort. 119: 147–152.

10- Gerami, M., A. Ghorbani, and S. Karimi, 2018. Role of salicylic acid pretreatment in alleviating cadmium-induced toxicity in *Salvia officinalis* L. Iranian J. Plant Biol. 10(1): 81-96

11- Ghorbani, A., S. M. Razavi, V. O. Ghasemi Omran, and H. Pirdashti, 2018a. *Piriformospora indica* alleviates salinity by boosting redox poise and antioxidative potential of tomato. Russ. J. Plant Physiol. 65(6): 898–907.

12- Ghorbani, A., S. M. Razavi, V. O. Ghasemi Omran, and H. Pirdashti, 2018b. *Piriformospora indica* inoculation alleviates the adverse effect of NaCl stress on growth, gas exchange and chlorophyll fluorescence in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). Plant Biol. 20(4): 729–736.

13- Gupta, M., P. Sharma, N. B. Sarin, and A. K. Sinha, 2009. Differential response of arsenic stress in two varieties of Brassica juncea L. Chemosphere 74: 1201–1208.

14- Hasanuzzaman, M., and M. Fujita, 2011. Selenium pretreatment up-regulates the antioxidant defense and methylglyoxal detoxification system and confers enhanced tolerance to drought stress in rapeseed seedlings. Biol. Trace Elem. Res. 143: 1758–1776.

15- Hasanuzzaman, M., and M. Fujita, 2013. Exogenous sodium nitroprusside alleviates arsenic-induced oxidative stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings by enhancing antioxidant defense and glyoxalase system. Ecotoxicology 22(3): 584–96.

16- Hasanuzzaman, M., S. S. Gill, M. Fujita, 2013. Physiological role of nitric oxide in plants grown under adverse environmental conditions. In: Tuteja N, Gill SS (eds) Plant acclimation to environmental stress. Springer, New York, pp 169–322.

17- Hasanuzzaman, M., M. A. Hossain, and M. Fujita, 2011. Nitric oxide modulates antioxidant defense and methylglyoxal detoxification system and reduces salinity induced damage in wheat seedling. Plant Biotecnol. Rep. 5: 353–365.

18- Heath, R. L. and L. Packer, 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. Arch. Biochem. Biophys. 125: 189–198.

19- Hossain, M. A., Y. Nakano, K. Asada, 1984. Monodehydroascorbate reductase in spinach chloroplasts and its participation in the regeneration of ascorbate for scavenging hydrogen peroxide. Plant Cell Physiol. 25: 385–395.

20- Hossain, M. Z., M. D. Hossain, and M. Fujita, 2006. Induction of pumpkin glutathione S-transferase by different stresses and its possible mechanisms. Biol. Plant 50: 210–218.

21- Hsu, Y. T., and C. H. Kao, 2004. Cd toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. Plant Growth Regul. 42: 227–238.

22- Huang, C., W. He, J. Guo, X. Chang, P. Su, and L. Zhang, 2005. Increased sensitivity to salt stress in ascorbate-deficient Arabidopsis mutant. J. Exp. Bot. 56: 3041–3049.

23- Innocenti, G., C. Pucciariello, M. L. Gleuher, J. Hopkins, M. de Stefano, M. Delledonne, A. Puppo, E. Baudouin, and P. Frendo, 2007. Glutathione synthesis is regulated by nitric oxide in *Medicago truncatula* roots. Planta, 225: 1597–1602.

24- Islam, M. M., M. A. Hoque, E. Okuma, R. Jannat, M. N. A. Banu, M. S. Jahan, Y. Nakamura, and Y. Murata, 2009. Proline and glycinebetaine confer cadmium tolerance on tobacco bright yellow-2 cells by increasing ascorbate-glutathione cycle enzyme activities. Biosci. Biotechnol. Biochem. 73: 2320–2323.

25- Kumari, A., S. Sheokand, and K. Swaraj, 2010. Nitric oxide induced alleviation of toxic effects of short term and long term Cd stress on growth, oxidative metabolism and Cd accumulation in chickpea. Braz. J. Plant Physiol. 22: 271–284.

26- Li, C., T. Li, D. Zhang, L. Jiang, and Y. Shao, 2013. Exogenous nitric oxide effect on fructan accumulation and FBEs expression in chilling-sensitive and chilling-resistant wheat. Environ. Exp. Bot. 86: 2–8.

27- Lei, Y., C. Yin, J. Ren, and C. Li, 2007. Effect of osmotic stress and sodium nitroprusside pretreatment on proline metabolism of wheat seedlings. Biol. Plant. 51: 386–390.

28- Mantri, N., V. Patade, S. Penna, R. Ford, and E. Pang, 2012. Abiotic stress responses in plants: present and future. In: Ahmad P, Prasad MNV (eds) Abiotic stress responses in plants: metabolism, productivity and sustainability. Springer, New York, pp 1–19

29- Mishra, S., A. B. Jha, and R. S. Dubey, 2011. Arsenite treatment induces oxidative stress, upregulates antioxidant system, and causes phytochelatin synthesis in rice seedlings. Protoplasma, 248: 565–577.

30- Mustafiz, A., K. K. Sahoo, S. L. Singla-Pareek, and S. K. Sopory, 2010. Metabolic engineering of glyoxalase pathway for enhancing stress tolerance in plants. Methods Mol. Biol. 639: 95–118.

31- Nakano, Y., and K. Asada, 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell. Physiol. 22: 867–880.

32- Namdjoyan, S., and H. Kermanian, 2013. Exogenous nitric oxide (as sodium nitroprusside) ameliorates arsenic-induced oxidative stress in watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.) plants. Sci Hort. 161: 350-356.

33- Noctor, G., A. Mhamdi, S. Chaouch, Y. Han, J. Neukermans, B. Marquez-Garcia, G. Queval, and C. H. Foyer, 2012. Glutathione in plants: an integrated overview. Plant Cell Environ. 35: 454–484.

34- Pourranjbari Saghaiesh, S., Souri, M.K., Moghaddam, M., 2019. Characterization of nutrients uptake and enzymes activity in *Khatouni melon* (*Cucumis melo* var. inodorus) seedlings under different concentrations of nitrogen, potassium and phosphorus of nutrient solution. J. Plant Nutr. 42, 178–185.

35- Principato, G. B., G. Rosi, V. Talesa, E. Govannini, and L. Uolila, 1987. Purification and characterization of two forms of glyoxalase II from rat liver and brain of Wistar rats. Biochem. Biophys. Acta. 911: 349–355.

36- Rubbo, H., R. Radi, D. Anselmi, M. Kirk, S. Barnes, J. Butler, J. P. Eiserich, and B. A. Freeman, 2000. Nitric oxide reaction with lipid peroxyl radicals spares alphatocopherol during lipid peroxidation. Greater oxidant protection from the pair nitric oxide/alphato-copherol than alpha-tocopherol/ascorbate. J. Biol. Chem. 275: 10812–10818.

37- Saxena, M., S. Deb Roy, S. L. Singla-Pareek, S. K. Sopory, and N. Bhalla-Sarin, 2011. Overexpression of the glyoxalase II gene leads to enhanced salinity tolerance in *Brassica juncea*. Open Plant Sci. J. 5: 23–28.

38- Schonfeld, M. A., R. C. Johnson, B. F. Carwer, and D.W. Mornhinweg, 1988. Water relations in winter wheat as drought resistance indicators. Crop Sci. 28: 526–531.

39- Seth, C. S., T. Remans, E. Keunen, M. Jozefczak, H. Gielen, K. Opdenakker, N. Weyens, J. Vangronsveld, and A. Cuypers, 2012. Phytoextraction of toxic metals: a central role for glutathione. Plant Cell. Environ. 35: 334–346.

40- Shi, S., G. Wang, Y. Wang, L. Zhang, and L. Zhang, 2005. Protective effect of nitric oxide against oxidative stress under ultraviolet-B radiation. Nitric Oxide 13: 1–9.

41- Shri, M., S. Kumar, D. Chakrabarty, P. K. Trivedi, S. Mallick, P. Misra, D. Shukla, S. Mishra, S. Srivastava, R. D. Tripathi, and R. Tuli, 2009. Effect of arsenic on growth, oxidative stress, and antioxidant system in rice seedlings. Ecotoxicol. Environ. Saf. 72: 1102–1110

42- Singh, H. P., S. Kaur, D. R. Batish, V. P. Sharma, and N. Sharma, 2009. Nitric oxide alleviates arsenic toxicity by reducing oxidative damage in the roots of *Oryza sativa* (rice). Nitric Oxide 20: 289–297.

43- Stoeva, N., M. Berova, and Z. L. Zlatev, 2005. Effect of arsenic on some physiological parameters in bean plants. Biol. Plant. 49: 293–296.

44- Tewari, A., R. Singh, N. K. Singh, and U. N. Rai, 2008. Amelioration of municipal sludge by Pistia stratiotes L.: Role of antioxidant enzymes in detoxification of metals. Bioresour. Technol. 18: 8715–8721.

45- Verbruggen, N., C. Hermans, and H. Schat, 2009. Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants. Curr. Opin. Plant Biol. 12: 364–372.

46- Xiong, J., G. Fu, L. Tao, and C. Zhu, 2010. Roles of nitric oxide in alleviating heavy metal

toxicity in plants. Arch. Biochem. Biophys. 497: 13–20.

47- Xu, J., W. Wang, H. Yin, X. Liu, H. Sun, and Q. Mi, 2010. Exogenous nitric oxide improves antioxidative capacity and reduces auxin degradation in roots of *Medicago truncatula* seedlings under cadmium stress. Plant Soil 326: 321–330.

48- Yadav, S. K., S. L. Singla-Pareek, M. Ray, M. K. Reddy, and S. K. Sopory, 2005. Transgenic tobacco plants overexpressing glyoxalase enzymes resist an increase in methylglyoxal and maintain higher reduced glutathione levels under salinity stress. FEBS Lett. 579: 6265–6271.

49- Yousuf, P. Y., K. U. R. Hakeem, R. Chandna, and P. Ahmad, 2012. Role of glutathione reductase in plant abiotic stress. In: Ahmad P, Prasad MNV (eds) Abiotic stress responses in plants: metabolism, productivity and sustainability. Springer, New York, pp 149–158

50- Yu, C. W., T. M. Murphy, and C. H. Lin, 2003. Hydrogen peroxide-induces chilling tolerance in mung beans mediated through ABA-independent glutathione accumulation. Funct. Plant Biol. 30: 955–963.

Effect of sodium nitroprusside on arsenic-induced oxidative stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings

Sadraei M.[1*], Tavasoli A.[1] and Mehraban A.[2]

[1] Islamic Azad University, Zahedan branch, Zahedan, I.R. of Iran.

[2] Dept. of agriculture, Payame Noor University of Zahedan, Zahedan, I.R. of Iran.

Abstract

In the present study, the possible regulatory role of sodium nitroprusside in mitigating oxidative stress in wheat seedlings exposed to arsenic (As) was investigated. 20-day-old seedlings were treated with As (0, 25 and 50 µM) and NO donor (0, 50 and 100 µM sodium nitroprusside) and hydroponically grown for 20 days. Higher As levels reduced the relative water content and chlorophyll content and increased proline content. Arsenic (50 µM) also increased the contents of malondialdehyde (173%), hydrogen peroxide (194%), reduced glutathione (GSH, 89%) and glutathione disulfide (GSSG, 138%), while decreased ascorbic acid (41%) and the ratio of GSH/GSSG (21%) compared to control. Increasing As concentrations enhanced the activity of ascorbate peroxidase, glutathione S-transferase and ascorbate peroxidase enzymes. Dehydro-azosporbate reductase and glyoxalase I activity decreased at both levels of arsenic, while glutathione peroxidase and glyoxalase II decreased only under 50 µm As. The activities of dehydroascorbate reductase and glyoxalase I decreased at any levels of As, while glutathione peroxidase and glyoxalase II activities decreased only upon 50 µm of As. The SNP treatment increased the RWC, chl and proline contents; AsA and GSH contents and the GSH/GSSG ratio as well as the activities of MDHAR, DHAR, GR, GPX, CAT, Gly I and Gly II in the seedlings subjected to As stress. These results suggest that the application of SNP rendered the plants more tolerant to As-induced oxidative damage by enhancing their antioxidant defense and glyoxalase system, which ultimately improved plant growth.

Key words: Antioxidant enzymes, Heavy metal toxicity, Glyoxalase system, Wheat, Sodium nitroprusside