زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال پنجم، شماره هجدهم، زمستان ۱۳۹۲، صفحه ۱-۱۴
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۱۲/۱۴
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۱/۰۶/۲۷
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۱/۰۹/۰۶
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۱/۰۹/۱۳

بررسی نقش حفاظتی نیتریک اکسید در کاهش آثار سمیّت آرسنیک اسید در اندام هوایی و ریشه گیاه ریحان سبز (*Ocimum basilicum* L.)

سعید زارع ده‌آبادی [۱]، زهرا اسرار [۱]*، عبدالحمید نمکی شوشتری [۱] و شهرام پورسیدی [۲]
[۱] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر، کرمان، ایران
[۲] گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر، کرمان، ایران

چکیده

نیتریک اکسید (NO) رادیکال آزاد بسیار فعال با طیف وسیعی از آثار فیزیولوژیک در گیاهان است. در پژوهش حاضر، آثار سدیم نیترو پروساید (SNP) به عنوان رها کننده نیتریک اکسید، بر سمیّت ناشی از فلز سنگین آرسنیک در دو بخش هوایی و زمینی گیاه ریحان بررسی شد. پیش‌تیمار گیاهچه‌ها با غلظت‌های صفر و ۱۵۰ میکرومولار سدیم نیترو پروساید در محلول غذایی هوگلند انجام شد. سپس، نمونه‌ها با غلظت‌های مختلف آرسنیک (صفر، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار) تیمار شدند. تیمار آرسنیک به ویژه در غلظت بالای آن باعث تجمع معنی‌دار پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، افزایش معنی‌دار پراکسیداسیون لیپیدها، نشت یونی غشا و کاهش رشد و بیوماس در برگ و ریشه گیاه شد. استفاده از پیش‌تیمار نیتریک اکسید پیش از آرسنیک میزان نشت یونی و پراکسیداسیون لیپیدها را کاهش داده، به افزایش پرولین، قندها و آمینو اسیدهای آزاد برگ و ریشه منجر شد. به طور کلی، نتایج نشان داد که آثار سمیّت آرسنیک اسید در ریشه گیاه ریحان بسیار شدیدتر از اندام‌های هوایی گیاه است و نیتریک اکسید احتمالاً از طریق افزایش ترکیبات پشتیبان به ویژه محافظت کننده‌های اسمزی از جمله پرولین، آمینو اسیدهای آزاد و قندهای محلول آستانه تحمل گیاه ریحان در برابر آرسنیک اسید را افزایش داده است. علاوه بر این، از داده‌های حاصل از سنجش آرسنیک در بخش‌های مختلف گیاه چنین بر می‌آید که پیش تیمار SNP باعث کاهش انتقال آرسنیک از ریشه به اندام‌های هوایی ریحان شده است و این کاهش به علت مصارف تغذیه‌ای اندام‌های هوایی ریحان توسط انسان از اهمیّت بسیار بالایی برخوردار است.

واژه‌های کلیدی: آرسنیک اسید، سدیم نیترو پروساید، نیتریک اکسید، رشد، ریحان سبز (*Ocimum basilicum* L.)

مقدمه

فلزات سنگین در خاک‌های سراسر دنیا و حدود نیمی از زمین‌های زراعی با پتانسیل تولید مواد غذایی وجود دارند و از عوامل اصلی محدودیت رشد گیاهان محسوب می‌شوند. پژوهش‌ها در بخش‌های شمال، شمال‌شرق و جنوب‌شرق آسیا نشان می‌دهد که استفاده

*نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: zasrar@mail.uk.ac.ir، شماره تماس: ۰۳۴۱۳۲۰۲۰۶۳

بیش از حد از علف‌کش‌ها و کودهای فسفر، انتشار پسماندهای ناشی از صنایع مس و طلا و رهاسازی آرسنیک از فاز جامد خاک توسط فعالیت‌های میکروبی، آب‌های زیرزمینی را به آرسنیک آلوده نموده است (Garg and Singla, 2011). شبه فلز آرسنیک برای گیاهان جزو عناصر غیر ضروری محسوب می‌شود و در سیستم‌های فیزیولوژیک و متابولیسمی گیاه کاربردی ندارد (Tu and Ma, 2005). این عنصر در آب نامحلول است، با وجود این، در ترکیب با برخی نمک‌ها به شکل محلول در آب در می‌آید. عواملی که بر اشکال آرسنیک موجود در گیاه تأثیر می‌گذارند عبارتند از: شکل‌های آرسنیک موجود در خاک، توانایی گیاهان برای جذب آرسنیک، فعال یا غیرفعال بودن فرآیند انتقال، توانایی گیاه در متابولیسم شکل‌های مختلف آرسنیک و حضور اشکال مختلف آرسنیک بر سطوح خارجی ریشه گیاه (Meharg and Hartley-Whitaker, 2002). برخی از پژوهشگران بر این عقیده‌اند که آرسنیک با اختلال در متابولیسم فسفر و کاهش فعالیت برخی آنزیم‌های حیاتی باعث افزایش تجمع گونه‌های فعال اکسیژن از جمله H_2O_2 در گیاه می‌شود (Singh *et al.*, 2009). در سال‌های اخیر، استفاده از آب‌های آلوده به آرسنیک برای آبیاری مزارع کشاورزی، به ویژه درباره برخی سبزیجات، باعث افزایش غلظت این آلاینده در خاک و انتقال آن به بخش‌های مختلف گیاه شده است. این افزایش به مختل شدن رشد طبیعی گیاهان با علایم سمیّت نظیر: کاهش بیوماس ریشه و ساقه، نکروزه شدن جوانه‌های برگی، کاهش سطح فتوسنتز و ... منجر می‌شود. گیاه ریحان سبز (*O. basilicum*) به علت مصرف دو جانبه تغذیه‌ای و دارویی، ارتباط مستقیمی با سلامت انسان‌ها دارد. بنابراین، بررسی پاسخ‌های این گیاه در برابر سمیّت آرسنیک و مطالعه وضعیت تجمع فلز در بخش‌های مختلف گیاه از اهمیّت بالایی برخوردار است. علاوه بر این، بررسی نقش برخی ترکیبات تخفیف دهنده تنش از جمله ترکیب نیتریک اکسید (NO) نیز می‌تواند در این امر راه گشا باشد.

گیاهان برای مقابله با آرسنیک و یا تحمل غلظت‌های بالای آن در خاک از راهکارهای آنزیمی و غیر آنزیمی متفاوتی استفاده می‌کنند. Jin و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که تغییر محتوای نیتریک اکسید داخلی یکی از مهم‌ترین پاسخ‌های گیاهان در برابر سمیّت آرسنیک است. این فلز در غلظت‌های سمّی به افزایش میزان NO داخلی در گیاه *Festuca arundinacea* منجر شده است، NO به عنوان محرک باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاه در پاسخ به تنش می‌شود. نیتریک اکسید مولکول گازی کوچک و محلول در چربی و آب است که در سال‌های اخیر به عنوان یک مولکول علامت‌رسان منحصر به فرد معرفی شده است. این ترکیب در سیستم‌های زیستی موجودات نقش‌های تنظیمی، علامت‌رسانی و حفاظتی متعددی را دارند. نیتریک اسید یک گونه واکنشگر نیتروژن است که به علت طبیعت رادیکالی بسیار فعال متناسب با غلظت استفاده شده آثار دو جانبه –همانند هورمون‌ها– سمیّتی و یا حفاظتی را نشان می‌دهد (Xiong *et al.*, 2010). نقش نیتریک اکسید به عنوان یک ترکیب آنتی اکسیدان قوی در تطابق به بسیاری از تنش‌های زیستی و غیر زیستی اثبات شده است. این مولکول به شدت واکنش‌پذیر بوده، توانایی پاک‌سازی واسطه‌های واکنشگر مانند گونه‌های

فعال اکسیژن و پایان دادن به تنش اکسیداتیو در گیاهان را دارد (Sun *et al*., 2007). تأثیر استفاده از نیتریک اکسید بیرونی بر کاهش آثار مخرب چندین فلز سنگین در گیاهان نیز مطالعه شده است. برخی پژوهشگران دریافته اند که سدیم نیترو پروساید به عنوان دهنده NO باعث کاهش انباشتگی آلومینیم در نوک ریشه و کاهش آثار سمیّت ناشی از فلز در گیاه *Cassia Javanica* می‌شود (Wang and Yang., 2005). همچنین، در گزارشی مشخص شده است که استفاده از NO به صورت خارجی باعث تخفیف تنش ناشی از فلز سنگین مس در گیاه گوجه‌فرنگی می شود. این ترکیب سبب تحریک سیستم‌های آنتی‌اکسیدان گیاه شده، از طریق کاهش تجمع پراکسید هیدروژن سایر آثار جانبی سمیّت مس در گیاه را کاهش می‌دهد. اغلب پژوهشگران بر این عقیده‌اند که نیتریک اکسید از طریق آثار متقابل با گونه‌های فعال اکسیژن باعث کاهش پراکسیداسیون لیپیدها در گیاهان تحت تنش می‌شود (Cui *et al*., 2010). برخی پژوهشگران معتقدند که NO از طریق تنظیم فعالیت غشای پلاسمایی و برخی کانال‌های کلسیمی موجود در غشاهای زیستی باعث تنظیم تعادل کلسیم در سلول‌های گیاهی و جانوری می‌شود و از این طریق نیز می‌تواند در ایجاد مقاومت در برابر تنش‌های محیطی در موجود ایفای نقش نماید (Besson-Bard *et al*. 2008). بررسی‌ها نشان داده است که استفاده از نیتریک اکسید خارجی معمولاً از دو راه باعث تخفیف سمیّت فلزات سنگین در گیاهان می‌شود: نخست، نیتریک اکسید از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و نابودی رادیکال‌های آزاد باعث کاهش تنش اکسیداتیو ایجاد شده توسط فلز سنگین می‌شود و دوم این که نیتریک اکسید از طریق اثر بر تمامیت غشای سلول‌های ریشه باعث افزایش تجمع فلز در ریشه و کاهش انتقال آن از ریشه به اندام‌های هوایی گیاه می‌شود (Xiong *et al*., 2010).

مواد و روش‌ها

کشت گلدانی و اعمال تیمارها

در پژوهش حاضر، بذرهای ریحان (*Ocimum basilicum* L.) از شرکت باران بذر تهران تهیه شد. بذرهای ریحان برای ایجاد دانه‌رُست در گلدان‌های پلاستیکی حاوی پرلیت قرار گرفته، به علت نیاز نوری آنها برای جوانه‌زنی در فاصله ۰/۵ تا یک سانتی‌متری از سطح کشت شد. نمونه‌ها در اتاق رشد با ۱۶ ساعت روشنایی (دمای ۲۸ درجه سانتیگراد)، ۸ ساعت تاریکی (دمای ۱۸ درجه سانتیگراد)، ۵۰ درصد رطوبت و ۱۰۰۰۰ لوکس نور قرار گرفت. از هفته دوم کشت گلدانی به منظور تأمین مواد غذایی مورد نیاز گیاه از محلول غذایی هوگلند (Hoagland and Arnon, 1950) با اسیدیته تقریبی ۰/۱ ± ۵/۷ استفاده شد. پس از سه هفته، نمونه‌ها با ترکیب SNP، به عنوان دهنده نیتریک اکسید، با دو سطح غلظت (صفر و ۱۵۰ میکرومولار) به مدت ۳ روز پیش تیمار شدند. سپس، نمونه‌ها در معرض آرسنیک اسید با غلظت‌های صفر، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار تهیه شده از نمک آرسنیک اسید هیدروژن دی سدیم (Na_2HAsO_4) قرار گرفتند. غلظت‌های استفاده شده در این مطالعه (SNP و As) بر اساس آزمایش های بهینه‌سازی اولیه تعیین شد. ۱۴ روز پس از تیمار آرسنیک، نمونه‌ها جمع‌آوری و شاخص‌های مورد نظر مطالعه شد.

اندازه‌گیری شاخص‌های رشد و محتوای آب برگ

شاخص های رشد مرتبط با سمیّت آرسنیک از جمله رشد طولی ریشه و اندام هوایی و وزن خشک آنها در گیاهان تیمارشده مطالعه شد. برای محاسبه درصد نسبی آب برگ، وزن تر (FW) اندام هوایی گیاهان اندازه‌گیری شد. سپس، نمونه‌ها به مدت ۵ ساعت در آب دوبار تقطیر قرار گرفتند و وزن تورژسانس (TW) آنها نیز اندازه‌گیری شد. نمونه‌ها به مدت ۷۲ ساعت در حمام آب گرم در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد خشک شده، سپس وزن خشک (DW) نمونه‌ها اندازه‌گیری شد و محتوای آب برگ (RWC) با استفاده از رابطه ۱ محاسبه شد (Turkan *et al*., 2005). FW: وزن تر، DW: وزن خشک، TW: وزن تورژسانس.

رابطه ۱: $RWC\ (\%)=(FW-DW)/(TW-DW)\times 100$

سنجش آسیب‌های غشایی در نمونه‌ها

برای سنجش غلظت مالوندی‌آلدئید (MDA) به عنوان شاخص واکنش پراکسیداسیون لیپیدها از روش Heath و Packer (۱۹۶۹) استفاده شد. مقدار پراکسید هیدروژن (H_2O_2) نیز بر اساس واکنش آن با یدید پتاسیم (KI) در نمونه‌ها تعیین شد (Velikova *et al*., 2000).

برای سنجش میزان آسیب به غشا میزان نشت یونی در برگ‌های گیاهان تیمار شده با آرسنیک و نیتریک اکسید از روش Ben Hamed و همکاران (۲۰۰۷) استفاده شد. ۰/۲ گرم از بافت سالم و تازه اندام هوایی گیاه پس از شستشوی یون‌های احتمالی از سطح گیاه با آب مقطر، درون لوله‌های آزمایش درپیچ‌دار قرار داده شد و ۱۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر به آن اضافه شد. سپس، لوله‌ها به مدت ۲ ساعت درون حمام آب‌گرم با دمای ۳۲ درجه سانتیگراد قرار گرفته، هدایت الکتریکی نمونه‌ها با استفاده از هدایت‌سنج الکتریکی اندازه‌گیری شد (EC_1). پس از آن، نمونه‌ها در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد برای مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شده و دوباره هدایت الکتریکی آنها اندازه‌گیری شد (EC_2). در نهایت، میزان نشت یونی (EL) در نمونه‌ها از رابطه ۲ محاسبه شد.

رابطه ۲: $EL=(EC_1/EC_2)\times 100$

اندازه‌گیری میزان پرولین و آمینو اسیدهای آزاد

برای اندازه‌گیری میزان پرولین از روش Bates (۱۹۷۳) استفاده شد. محتوای آمینو اسیدهای آزاد در نمونه‌ها از طریق رنگ‌سنجی با نین‌هیدرین به دست آمد. ۰/۲ گرم بافت تازه در ۵ میلی‌لیتر بافر پتاسیم سرد ۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۶/۸ ساییده، به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۸۰۰۰ g سانتریفیوژ شد. از محلول رویی برای سنجش آمینو اسیدهای آزاد استفاده شد. یک میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین به ۵ میلی‌لیتر نمونه افزوده شد. سپس، لوله‌ها ۴ تا ۷ دقیقه در حمام آب‌گرم با دمای ۹۵ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. پس از سرد شدن، جذب نمونه‌ها در ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. برای محاسبه مقدار آمینو اسیدهای آزاد از منحنی استاندارد گلایسین استفاده شد (Hwang and Ederer, 1975).

سنجش محتوای کربوهیدرات‌ها

محتوای کربوهیدرات‌های محلول با معرف آنترون و بر اساس منحنی استاندارد گلوکز بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه شد (Fales, 1951). برای محاسبه غلظت قندهای احیا کننده در برگ و ریشه از روش Somogy (۱۹۵۲) استفاده شد. محتوای قندهای غیر احیا کننده نیز از تفاضل بین قند کل محلول از قندهای احیا کننده به دست آمد.

تحلیل مقدار آرسنیک در اندام هوایی و ریشه گیاه

برای بررسی وضعیت جذب آرسنیک توسط گیاه و تأثیر پیش‌تیمار SNP بر جذب و انتقال این شبه فلز، مقدار آرسنیک در اندام‌های گیاه با روش ICP (Inductively Coupled Plasma Spectrometry) اندازه‌گیری شد. بدین منظور ۰/۵ گرم بافت گیاهی در ۱۰ میلی‌لیتر نیتریک اسید غلیظ به مدت ۲۴ ساعت حل شد. برای خروج بخار اسیدی، نمونه‌ها حرارت داده شد و حجم نهایی لوله‌ها با آب دوبار تقطیر به ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. پس از گذراندن از کاغذ صافی و سانتریفیوژ از محلول رویی برای سنجش آرسنیک استفاده شد.

تحلیل داده‌ها

این پژوهش به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸ و آزمون ANOVA انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح خطای ۵ درصد و رسم نمودارها با نرم‌افزار Excel انجام شد.

نتایج

همان طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، آرسنیک باعث کاهش معنی‌دار شاخص‌های مربوط به رشد از جمله: رشد طولی و وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه در گیاه ریحان شده است. بررسی شاخص‌های رشد گیاه نشان می‌دهد که تیمار آرسنیک اسید در بخش ریشه‌ای ریحان آثار مخرب‌تری داشته است. حضور آرسنیک در محلول غذایی گیاهان باعث کاهش محتوای آب برگ شد، به طوری که در غلظت ۳۰۰ میکرومولار تا ۳۰ درصد آب برگ را کاهش داد. اما در نمونه‌هایی که با سدیم نیترو پروساید پیش‌تیمار شده بودند، بسیاری از عوامل رشد از جمله: رشد طولی گیاه، مقدار بیوماس و محتوای آب برگ در آنها در حضور آرسنیک نسبت به نمونه‌های بدون پیش‌تیمار افزایش معنی‌داری داشت ($P\leq0.05$).

جدول ۱- آثار متقابل As و SNP بر برخی شاخص‌های رشد و محتوای آب برگ در گیاه ریحان (*O. basilicum*). داده‌ها میانگین ۳ تکرار ±SE است. حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن است. * اختلاف معنی‌دار در سطح $P\leq0.05$ است.
As: آرسنیک، NO: نیتریک اکسید، L: طول، FW: وزن تر، DW: وزن خشک، RWC: محتوای آب برگ.

تیمار		ساقه			ریشه			Leaf RWC
As (µM)	NO (µM)	L (cm/plant^{-1})	FW (g/plant^{-1})	DW (g/plant^{-1})	L (cm/plant^{-1})	FW (g/plant^{-1})	DW (g/plant^{-1})	%
۰	۰	۴۲/۱۰ ^{a}	۷/۰۸ ^{a}	۱/۰۰۹ ^{a}	۲۸/۴۰ ^{a}	۴/۵۴ ^{a}	۰/۳۰۱ ^{a}	۹۲/۰۶ ^{a}
۱۵۰	۰	۲۵/۱۶ ^{c}	۲/۷۰ ^{d}	۰/۵۰۴ ^{d}	۱۵/۲۶ ^{cd}	۱/۵۶ ^{c}	۰/۱۲۸ ^{c}	۷۸/۴۰ ^{cd}
۳۰۰	۰	۱۶/۸۳ ^{d}	۰/۷۳ ^{e}	۰/۱۳۴ ^{f}	۱۰/۲۰ ^{d}	۰/۵۲ ^{d}	۰/۰۵۵ ^{d}	۶۳/۴۹ ^{e}
۰	۱۵۰	۳۹/۹۰ ^{a}	۵/۸۹ ^{b}	۰/۸۶۵ ^{b}	۲۵/۰۶ ^{ab}	۴/۴۲ ^{a}	۰/۲۶۸ ^{ab}	۸۷/۰۶ ^{ab}
۱۵۰	۱۵۰	۳۱/۳۰ ^{b}	۴/۲۸ ^{c}	۰/۶۹۰ ^{c}	۱۱/۰۰ ^{bc}	۲/۹۰ ^{b}	۰/۲۱۹ ^{b}	۸۲/۶۶ ^{bc}
۳۰۰	۱۵۰	۲۵/۲۶ ^{c}	۲/۷۳ ^{d}	۰/۳۴۷ ^{e}	۱۶/۰۳ ^{cd}	۱/۸۵ ^{c}	۰/۱۴۴ ^{c}	۷۳/۷۶ ^{d}

محتوای مالون‌دی‌آلدئید و پراکسید هیدروژن، به عنوان دو شاخص تنش اکسیداتیو، در برگ‌های ریحان با افزایش غلظت آرسنیک در محلول غذایی افزایش معنی‌داری داشت، در حالی که در نمونه‌های پیش‌تیمار شده با SNP مقدار آنها در برگ و ریشه به طور معنی‌داری کاهش یافت. مقایسه تغییرات محتوای مالون‌دی‌آلدئید و سایر آلدئیدها در ریشه و اندام هوایی گیاهان تیمار شده گویای این مطلب است که افزایش این ترکیبات در اثر سمیّت آرسنیک در ریشه نسبت به اندام هوایی به مراتب بیشتر است و این نشان دهنده خسارت بیشتر لیپیدهای غشایی در ریشه در اثر تنش است (جدول ۲).

جدول ۲- آثار متقابل As و SNP بر محتوای مالون‌دی‌آلدئید (MDA)، سایر آلدئیدها (Other A) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در ریشه و اندام هوایی ریحان. حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن است. * اختلاف معنی‌دار در سطح $P\leq0.05$ است.
As: آرسنیک، NO: نیتریک اکسید

تیمار		ساقه			ریشه		
As (µM)	NO (µM)	MDA (nmol/gFw)	Other A (nmol/gFw)	H_2O_2 (µmol/gFw)	MDA (nmol/gFw)	Other A (nmol/gFw)	H_2O_2 (µmol/gFw)
۰	۰	۳۰/۱۰ d	۲۹۹/۱ c	۵/۶۹ d	۲۰/۴۳ d	۲۳۰/۴۸ h	۳/۲۳ c
۱۵۰	۰	۱۲۰/۴۳ c	۱۰۰۶/۵ b	۲۱/۱۹ c	۱۴۷/۹۵ b	۱۰۲۰/۴ f	۲۰/۱۷ b
۳۰۰	۰	۳۱۱/۸۲ a	۲۰۴۹/۵ a	۴۳/۰۳ a	۳۸۴/۰۸ a	۱۶۰۵/۳ e	۳۲/۵۱ a
۰	۱۵۰	۳۴/۴۰ d	۵۴۷/۱ bc	۷/۹۱ d	۲۳/۶۵ d	۲۳۹/۲ h	۴/۷۸ c
۱۵۰	۱۵۰	۶۰/۲۱ d	۵۱۰/۵ c	۱۱/۵۸ d	۹۵/۶۹ c	۷۳۸/۱ g	۱۱/۶۰ c
۳۰۰	۱۵۰	۲۶۴/۵۱ b	۱۶۱۱/۹ a	۳۴/۶۲ b	۱۸۵/۸۰ b	۹۰۵/۹ fg	۲۴/۵۸ ab

تحلیل نتایج مربوط به محتوای کربوهیدرات‌های گیاه پاسخ متفاوت بخش‌های هوایی و زمینی ریحان در برابر تنش را نشان می‌دهند. تنش آرسنیک در بخش هوایی گیاه، میزان قند محلول و احیا کننده را افزایش داد، در حالی که در ریشه گیاه این دو شاخص تحت تنش آرسنیک طور معنی‌داری کاهش یافت. در حالی که محتوای قندهای غیر احیا کننده در هر دو بخش برگ و ریشه گیاه روند کاهشی داشت. به هر حال، سدیم نیترو پروساید باعث بهبود وضعیت متابولیسم کربوهیدرات‌ها در گیاه شد. گیاهانی که با ترکیب SNP پیش‌تیمار شده بودند، در مقایسه با گیاهان بدون پیش‌تیمار، تحت تنش آرسنیک اسید محتوای قند محلول و قند احیا کننده در بخش‌های هوایی آنها کاهش نشان داد (جدول ۳).

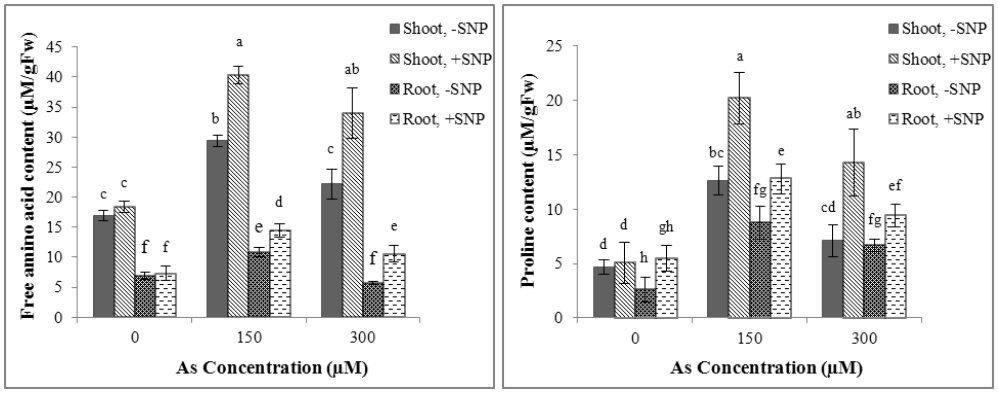
محتوای پرولین و آمینو اسیدهای آزاد در پاسخ به آرسنیک روندی افزایشی داشت و بیشترین مقدار آنها در غلظت ۱۵۰ میکرومولار آرسنیک مشاهده شد. حضور نیتریک اکسید در رژیم غذایی گیاهان تیمار شده با As باعث افزایش معنی‌دار مقدار پرولین و آمینو اسیدهای آزاد در ریشه و اندام هوایی ریحان شد (شکل ۱).

نتایج مربوط به نشت یونی غشا در شکل ۲ نشان داده شده است. این نتایج به همراه داده‌های مربوط به پراکسیداسیون لیپیدها گویای این مطلب است که آرسنیک به ویژه در غلظت بالا باعث کاهش تمامیت غشای سلول‌های گیاه ریحان شده است. بر اساس نتایج حاصل از ICP، تیمار گیاهان با آرسنیک باعث تجمع بالای این شبه فلز در ریشه ریحان شده است، در حالی

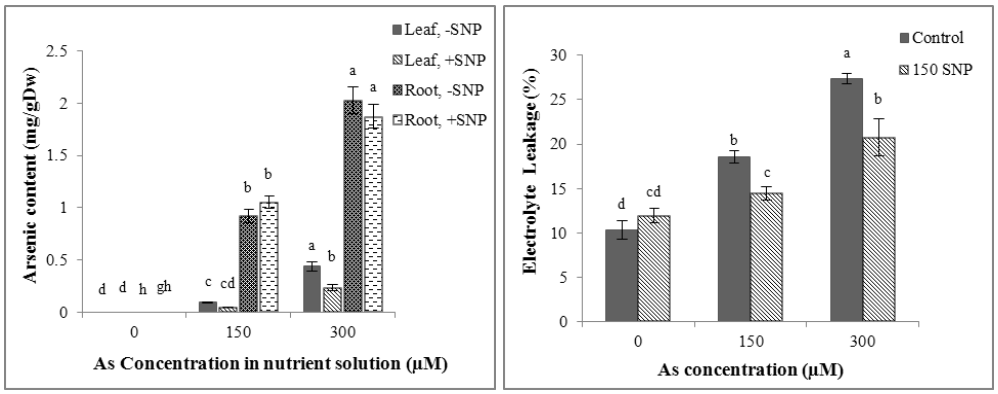
که افزایش معنی‌دار و درخور توجه محتوای As در برگ در تیمار ۳۰۰ µM As مشاهده شد. پیش‌تیمار گیاهان با دهنده NO پیش از تنش آرسنیک، تجمع آرسنیک در اندام‌های هوایی گیاه را کاهش داد، با وجود این، اثر معنی‌داری بر محتوای آرسنیک ریشه ریحان نداشت (شکل ۲).

جدول ۳- آثار متقابل As و SNP بر محتوای قند محلول (S. Sugar)، قند احیا کننده (R. Sugar) و قند غیر احیا (N-R. Sugar) در ریشه و اندام هوایی ریحان. حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن است. * اختلاف معنی‌دار در سطح P≤0.05 است.

تیمار		ساقه			ریشه		
As (µM)	NO (µM)	S. Sugar (mg/gFw)	R. Sugar (mg/gFw)	N-R. Sugar (mg/gFw)	S. Sugar (mg/gFw)	R. Sugar (mg/gFw)	N-R. Sugar (mg/gFw)
۰	۰	۱۱/۵۳ d	۵/۳۷ d	۶/۱۵ abc	۹/۳۷ a	۵/۲۰ a	۴/۱۷ a
۱۵۰	۰	۵۸/۲۹ a	۵۴/۴۷ a	۳/۸۲ cd	۲/۹۱ bc	۱/۵۷ bc	۱/۳۳ ab
۳۰۰	۰	۴۲/۲۳ b	۴۰/۸۹ b	۱/۳۳ d	۰/۸۱ c	۰/۵۳ c	۰/۲۸ b
۰	۱۵۰	۱۵/۵۷ d	۸/۰۴ d	۷/۵۳ a	۷/۰۴ ab	۳/۵۷ ab	۳/۴۶ a
۱۵۰	۱۵۰	۴۳/۲۱ b	۳۵/۹۲ b	۷/۲۹ ab	۸/۱۶ a	۴/۴۶ a	۳/۶۹ a
۳۰۰	۱۵۰	۲۸/۴۵ c	۲۳/۷۱ c	۴/۷۴ bc	۵/۸۲ ab	۵/۲۷ ab	۲/۵۵ ab



شکل ۱- بر همکنش As و SNP بر محتوای پرولین و آمینو اسیدهای آزاد در ریشه و اندام هوایی ریحان. مقادیر، میانگین ۳ تکرار ± SE است. حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن است.



شکل ۲- بر همکنش As و SNP بر نشت یونی غشا و مقدار آرسنیک در ریشه و برگ ریحان سبز. مقادیر، میانگین ۳ تکرار ± SE است. حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن است.

بحث و نتیجه‌گیری

اغلب پژوهشگران عامل اصلی آثار سمّی آرسنیک بر گیاهان را افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در گیاه تحت تنش می‌دانند. بنابراین، افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی، کاهش فتوسنتز و تنفس از طریق تخریب غشاهای کلروپلاست و میتوکندری، کاهش رشد و تغییر بیوماس، کاهش محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی و به طور کلی القای تنش اکسیداتیو در گیاهان آلوده شده به آرسنیک امری اجتناب‌ناپذیر است. کاهش رشد در اثر سمیّت فلز سنگین می‌تواند به علت افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن از جمله پراکسید هیدروژن در واکنش‌های نوری فتوسنتز باشد (Maksymiec, 2007؛ Gunes *et al*., 2009). مهار پمپ پروتون و کاهش جذب مواد غذایی نیز از دیگر علت‌های احتمالی کاهش رشد توسط فلزات سنگین است (Chen *et al*., 2007). یکی از آسیب‌های جدی ناشی از حضور فلزات سنگین در محیط، خسارت به غشا و رهاسازی یون‌ها از سلول به فضای بین سلولی است. این پدیده نتیجه تجمع ROS است که به پراکسیداسیون لیپیدها، نفوذپذیری غشا و خسارت به سلول منجر می‌شود (Cui *et al*., 2010). در پژوهش حاضر، آثار مهاری آرسنیک اسید در ریشه گیاه ریحان شدیدتر از اندام هوایی بود. علت آن می‌تواند این باشد که ریشه نخستین بخش از گیاه است که در تماس با گونه‌های سمّی آرسنیک در محلول غذایی است. این نتایج با نتایج حاصل از مطالعات Shri و همکاران (۲۰۰۹) در گیاه برنج هم‌خوانی دارد. این پژوهشگران معتقدند که آثار سمّی آرسنیک در ریشه می‌تواند به علت کاهش انتقال آرسنیک از ریشه به اندام هوایی در اثر کده‌بندی آن در واکوئل‌های ریشه باشد. به هر حال، در غلظت‌های بالای آرسنیک به‌هم‌ریختگی وضعیت ساختاری و عملکردی غشا ممکن است باعث کاهش انتقال مواد از محیط به ریشه گیاه می‌شود که می‌تواند رشد را تحت تأثیر قرار دهد.

اندازه گیری محصولات پراکسیداسیون لیپید یکی از معمولی‌ترین و قابل قبول‌ترین روش‌های اندازه‌گیری آسیب های اکسیداتیو به غشاست و به میزان وسیعی در گیاهان استفاده می شود. رادیکال‌های آزاد اکسیژن با پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع، آلدئیدهایی نظیر مالون‌دی‌آلدهید تولید می کنند که این محصولات آلدئیدی معمولاً به عنوان شاخص تنش اکسیداتیو اندازه‌گیری می‌شوند (Sun *et al*., 2007). در پژوهش حاضر، پیش‌تیمار SNP میزان مالون‌دی‌آلدهید و نشت یونی غشا در نمونه‌های در معرض آرسنیک را نسبت به گیاهان شاهد به طور معنی‌داری کاهش داد. گزارش شده است که نقش NO در جلوگیری از پراکسیداسیون و آسیب‌های دیگر غشایی به علت توانایی آن در واکنش با رادیکال‌های لیپید آلکوکسیل (LO) و لیپید پراکسیل (LOO) و توقف زنجیره پراکسیداسیون است (Beligni and Lamatina, 1999). علاوه بر این، گزارشی وجود دارد که نیتریک اکسید فعالیت آنزیم لیپواکسیژناز در مسیر پراکسیداسیون لیپیدها را با احیای آهن جایگاه فعال از شکل فریک (Fe^{+3}) به شکل فرو (Fe^{+2}) باز می‌دارد که در حفظ ساختار و تمامیت غشاهای زیستی در مقابله با سمیّت فلز سنگین آرسنیک نقش اساسی داشته است (Zhu *et al*., 2006).

در گزارش‌های علمی درباره عملکرد ترکیب پرولین در گیاهان تحت تنش، اغلب ویژگی اسمولیت آن برای

حفظ تعادل آب بیان شده است، اما سایر نقش‌های مفید پرولین تحت شرایط تنش حفظ ثبات پروتئین‌ها، جاروب کردن رادیکال‌های هیدروکسیل و تنظیم اسیدیته سلول است (Matysik *et al*., 2002). به نظر می‌رسد که تجمع پرولین باعث حفظ بیشتر آب در سلول‌ها می‌شود که کارآیی مصرف آب را در گیاهان بالا می‌برد (Rai *et al*., 2002). همچنین، پرولین جاروب کننده رادیکال‌های اکسیژن یکتایی و هیدروکسیل است و باعث افزایش پایداری غشا و در نهایت، کاهش آسیب‌های حاصل از تنش می‌شود (Sharma and Dietz, 2006). افزایش مقدار پرولین در گیاهان در مواجهه با برخی تنش‌های محیطی مانند خشکی (Nayyar, 2003) و سمیّت فلزات سنگین (Alia and Saradhi, 1991) گزارش شده است. در پژوهش حاضر، پیش‌تیمار گیاهان با SNP باعث افزایش مقدار پرولین تحت شرایط تنش شده است. به نظر می‌رسد نیتریک اکسید نقش القایی در بیوسنتز پرولین در این شرایط داشته است. گزارش شده است که NO از طریق بیوسنتز ABA باعث افزایش سنتز پرولین می‌شود (Zhang, 2005). علاوه بر این، القای فعالیت آنزیم پیرولین ۵-کربوکسیلاز به عنوان آنزیم اصلی در مسیر بیوسنتز پرولین، توسط NO در گیاهچه در حال رشد برنج تحت تنش شوری گزارش شده است (Uchida *et al*., 2002). این موضوع نیز می‌تواند علت احتمالی برای افزایش پرولین مشاهده شده در پژوهش حاضر باشد، با وجود این، برای بیان دقیق‌تر آن اندازه‌گیری فعالیت آنزیم لازم است. علاوه بر این، با توجه به این که پرولین و نیتریک اکسید برای سنتز گهرمایه مشترکی (آرژنین) دارند، چنین به نظر می‌رسد که اضافه نمودن NO بیرونی در این آزمایش باعث مصرف بیشتر آرژنین برای سنتز پرولین در سلول‌های تحت تنش شده و این مقدار پرولین گیاه را افزایش می‌دهد.

بررسی کلی محتوای کربوهیدرات‌های اندام هوایی و ریشه ریحان در حضور آرسنیک و نیتریک اکسید در این مطالعه تأثیر شدید فلز آرسنیک بر وضعیت فتوسنتز و مقدار قندها در گیاهان را نشان می‌دهد. این اثر در بخش‌های مختلف گیاه متفاوت بود، به طوری که در اندام‌های هوایی قند محلول و قند احیا کننده افزایش یافته، در حالی که محتوای قند غیر احیا کننده تغییر چندانی نداشت و حتی کاهش یافت. این در حالی است که در بخش ریشه‌ای محتویات قندهای اندازه‌گیری شده روند کاهشی داشت که ممکن است به علت تخریب شدید متابولیسم قند در ریشه در اثر آرسنیک به ویژه در غلظت ۳۰۰ میکرومولار باشد. افت فتوسنتزی و کاهش احتمالی انتقال کربوهیدرات‌ها از اندام‌های هوایی به ریشه نیز می‌تواند علت دیگری بر افت قندها در ریشه باشد. نتایج مربوط به محتوای آب برگ و کاهش وزن تر اندام هوایی و ریشه نتیجه القای تنش اسمزی در اثر تنش آرسنیک در گیاه ریحان است. بنابراین، افزایش نسبت قندهای احیایی به غیر احیایی در گیاه امری اجتناب‌ناپذیر است. نتایج پژوهش Jha و Dubey (۲۰۰۴) نشان داده است که در گیاه برنج، آرسنیک تبدیل قندهای غیر احیایی مانند سوکروز به قندهای احیایی مانند گلوکز و فروکتوز را افزایش داده و آنزیم‌های سازنده سوکروز مانند سوکروز فسفات سنتتاز را مهار می‌کند. همچنین، فعالیت آنزیم‌های تجزیه کننده سوکروز مانند اینورتاز و سوکروز سینتتاز در اثر آرسنیک افزایش یافته است. بنابراین، آرسنیک احتمالاً با

مهار فعالیت آنزیم‌های تجزیه کننده نشاسته مانند آمیلازها و تحریک آنزیم‌های تجزیه کننده سوکروز باعث تجمع نشاسته و کاهش حجم مخزن سوکروز در گیاه می‌شود که می‌تواند توجیهی بر افزایش قندهای محلول و احیایی در اثر آرسنیک در پژوهش حاضر باشد. البته برای بیان دقیق‌تر این موضوع بررسی‌های بیشتری نیاز است. از شاخص‌ترین علایم سمیّت فلزات سنگین در گیاهان، مهار رشد و افت فتوسنتز است (Pal *et al.*, 2006). کاهش رشد می‌تواند به علت مهار تقسیم سلولی، کاهش سنتز ترکیبات دیواره، خسارت به دستگاه گلژی و اختلال در متابولیسم ساکاریدها باشد (Punz and Sieghardt, 1993). در پژوهش حاضر، اختلال ایجاد شده در اثر آرسنیک در متابولیسم قندها در گیاه ریحان احتمالاً باعث به‌هم‌ریختگی وضعیت کده‌بندی قندها در سلول شده است که در نهایت به افت شدید شاخص‌های مربوط به رشد گیاه منجر می‌شود. با وجود این، چنین به نظرمی رسد ترکیب نیتریک اکسید از طریق حفظ ساختار و تمامیت غشاهای زیستی و کاهش محتوای گونه‌های فعال اکسیژن در گیاه باعث بهبود وضعیت تعادل آبی گیاه و کاهش خسارات ناشی از سمیّت آرسنیک بر متابولیسم گیاه شده است. اثر نیتریک اکسید بر محتوای پرولین، آمینو اسیدهای آزاد و کربوهیدرات‌ها در بخش‌های مختلف ریحان گویای این مطلب است.

بررسی شیوه تجمع آرسنیک در اندام‌های گیاه تحت تیمارها نشانگر این مطلب است که احتمالاً ریحان در غلظت پایین آرسنیک از طریق مکانیسم‌های دفاعی نظیر: القای سنتز فیتوکلاتین، گلوتاتیون و پرولین، به ویژه در ریشه، As را در اندامک‌های ریشه کده‌بندی نموده، از انتقال آن به بخش های بالایی گیاه جلوگیری می‌کند. با وجود این، به نظر می‌رسد که غلظت ۳۰۰ میکرومولار As خارج از توان گیاه در دفع سمیّت این شبه فلز بوده، مقداری از آن به اندام‌های هوایی نیز انتقال یافته است. القای سنتز فیتوکلاتین به عنوان مهم‌ترین ترکیب کمپلکس دهنده و سمیّت‌زدا در پاسخ به آرسنیک در برخی گیاهان گزارش شده است (Grill *et al.*, 1985؛ Garg and Singla, 2011). Wojasa و همکاران (۲۰۱۰) با بررسی بیان ژن‌های مربوط به بیوسنتز فیتوکلاتین در تنباکو که در معرض آرسنیک قرار گرفته بودند، مشخص شد که غلظت‌های اندک این شبه فلز با تحریک بیان ژن های AtPCS1 و CePCS باعث افزایش متابولیسم تیول‌ها و تجمع فیتوکلاتین در ریشه و برگ گیاه شده است، در حالی که غلظت‌های بالا و سمّی As با به‌هم‌ریختگی متابولیسم تیول‌ها محتوای فیتوکلاتین گیاه را کاهش می‌دهد. آرسنیک اسید در ریشه گیاه توسط آنزیم آرسنیک اسید ردوکتاز در یک واکنش وابسته به گلوتاتیون به آرسنیت احیا می‌شود (Smith *et al.*, 2010). سپس، آرسنیت توسط فیتوکلاتین به صورت کمپلکس As-PC توسط ناقل‌های ویژه در واکوئل‌ها کده‌بندی می‌شود (Tong *et al.*, 2004). پژوهشگران با بررسی شیره خام گیاه *Helianthus annuus*، اثری از کمپلکس As-PC در آن مشاهده نکرده‌اند و این بیانگر این است که آرسنیک به شکل کمپلکس با PC از ریشه به برگ‌ها انتقال نمی‌یابد (Raab *et al.*, 2005). نتایج مربوط به تأثیر SNP بر تجمع آرسنیک اسید در گیاه گویای این مطلب است که نیتریک اکسید بدون آنکه بر جذب فلز توسط ریشه ریحان اثری داشته باشد باعث

کاهش معنی‌دار آرسنیک اسید در اندام‌های هوایی گیاه شده است و این احتمالاً از طریق اثر مهاری نیتریک اکسید بر کاهش انتقال As از ریشه به برگ است. Hu و همکاران (۲۰۰۷) نتایج مشابهی روی گیاه گندم به دست آورده‌اند، به طوری که پیش‌تیمار دانه گندم با SNP بدون تأثیر بر جذب فلز مس توسط گیاه باعث کاهش خسارات اکسیداتیو ناشی از آن شده است.

جمع‌بندی

نتایج حاصل از پژوهش حاضر آستانه تحمل گیاه ریحان در برابر آرسنیک اسید تا غلظت ۱۵۰ میکرومولار را نشان می‌دهد. این در حالی است که غلظت‌های ۳۰۰ میکرومولار آرسنیک اسید خسارت‌های شدیدی به ویژه به رشد و بیوماس گیاه وارد نموده است. با وجود این، بررسی‌ها در این پژوهش درباره اثر ترکیب نیتریک اکسید نشان داد که این ترکیب احتمالاً از طریق حفظ تمامیت غشاهای زیستی، کاهش محتوای گونه‌های فعال اکسیژن و تغییر متابولیسم برخی ترکیبات سلولی، آستانه تحمل گیاه ریحان در برابر آرسنیک اسید را افزایش می‌دهد. همچنین، بر اساس نتایج مربوط به تجمع آرسنیک اسید در بخش‌های مختلف گیاه می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که نیتریک اکسید به احتمال زیاد بیشتر از طریق القای مکانیسم تحمل (tolerance) و نه اجتناب (avoidance) آسیب اکسیداتیو ناشی از آرسنیک در گیاه ریحان را کاهش می‌دهد.

سپاسگزاری

نگارندگان از جناب آقای حسین مظفری بابت همکاری صمیمانه در این پژوهش قدردانی می‌نمایند.

منابع

Chen, B. D., Christie, P., Zhu, Y. G., Smith, F. A., Xie, Z. M. and Smith, S. E. (2007) The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* gives contradictory effects on phosphorous and arsenic acquisition by *Medicago sativa*. Science Total Environment 379: 226-234.

Cui, X. M., Zhang, Y. K., Wu, X. B. and Liu, C. S. (2010) The investigation of the alleviated effect of copper toxicity by exogenous nitric oxide in tomato plants. Plant, Soil and Environment 56(6): 274-281.

Fales, F. W. (1951) The assimilation and degradation of carbohydrates by yeast cells. Biological Chemistry 193: 113-124.

Garg, N. and Singla, P. (2011) Arsenic toxicity in crop plants: physiological effects and tolerance mechanisms. Environment Chemistry Letter 9: 303-321.

Alia, P. and Saradhi, P. (1991) Proline accumulation under heavy metal stress. Plant Physiology 138: 554-558.

Bates, L. S. (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil 39: 205-207.

Beligni, M. V. and Lamatina, L. (1999) Nitric oxide counteracts cytotoxic processes mediated by reactive oxygen species in plant tissues. Planta 208: 337-344.

Ben Hamed, K., Castagna, A., Salem, E., Ranieri, A. and Abdelly, C. (2007) Sea fennel (*Crithmum maritimum* L.) under salinity conditions: a comparison of leaf and root antioxidant responses. Plant Growth Regulation 53: 185-194.

Besson-Bard, A., Pugin, A. and Wendehenne, D. (2008) New insights into nitric oxide signaling in plants. Annual Review of Plant Biology 59: 21-39.

Grill, E., Winnacker, E. L. and Zenk, M. H. (1985) Phytochelatins: the principal heavy metal complexing peptides of higher plants. Science 230: 674-676.

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(1-2): 211-220.

Heath, R. L. and Packer, L. (1969) Photo peroxidation in isolated chloroplast: kinetic and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archive of Biochemistry and Biophysics 125: 189-198.

Hoagland, D. R. and Arnon, D. I. (1950) The water culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station 347: 1-32.

Hu, K., Hu, L., Li, Y., Zhang, F. and Zhang, H. (2007) Protective roles of nitric oxide on germination and antioxidant metabolism in wheat seeds under copper stress. Plant Growth Regulation 53: 173-183.

Hwang, M. and Ederer, G. M. (1975) Rapid hippurate hydrolysis method for presumptive identification of group B streptococci. Journal of Clinical Microbiology 1(1): 114-115.

Jha, A. B. and Dubey, R. S. (2004) Carbohydrate metabolism in growing rice seedling under arsenic toxicity. Plant Physiology 161: 867-872.

Jin, J. V., 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(11): 1619-1627.

Maksymiec, W. (2007) Signaling responses in plants to heavy metal stress. Acta Physiologia Plantarum 29: 177-187.

Matysik, J., Alia, B., Halu, B. and Mohanty, P. (2002) Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. Current Science 82: 525-532.

Meharg, A. A. and Hartley-Whitaker, J. (2002) Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. New Phytologist 154: 29-43.

Nayyar, H. (2003) Accumulation of osmolytes and osmotic adjustment in water-stressed wheat (*Triticum aestivum*) and maize (*Zea mays*) as affected by calcium and its antagonists. Environmental Experimental Botany 50: 253-264.

Pal, M., Horvath, E., Janda, T., Paldi, E. and Szalai, G. (2006) Physiological changes and defense mechanisms induced by cadmium stress in maize. Plant Nutrition Soil Science 169: 239-246.

Punz, W. F. and Sieghardt, H. (1993) The response of roots of herbaceous plant species to heavy metals. Environmental Experimental Botany 33: 85-98.

Raab, A., Schar, H., Meharg, A. A. and Feldmann, J. (2005) Uptake, translocation of arsenate and arsenite in sunflower (*Helianthus annuus*): formation of arsenic-phytochelatin complexes during exposure to high arsenic concentrations. The New Phytologist 168: 551-558.

Rai, V. K., Sharma, S. S. and Sharma, S. (2002) Role of amino acids in plant responses to stresses. Biologia Plantarum 45 (4): 481-487.

Sharma, S. S. and Dietz, K. J. (2006) The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. Journal of Experimental Botany 57: 711-726.

Shri, M., Kumar, S., Chakrabarty, D., Trivedi, P. K., Mallick, S., Misra, 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 seedlings. Ecotoxicology and Environmental Safety 72: 1102-1110.

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

Smith, S. E., Christophersen, H. M., Pope, S. and Smith, F. A. (2010) Arsenic uptake and

toxicity in plants: integrating mycorrhizal influences. Plant and Soil 327: 1-21.

Somogy, M. (1952) Notes on sugar determination. Biological Chemistry 195: 19-29.

Sun, B., Jing, Y., Chen, K., Song, L., Chen, F. and Zhang, L. (2007) Protective effect of nitric oxide on iron deficiency-induced oxidative stress in maize (*Zea mays*). Plant Physiology 164: 536-543.

Tong, Y. P., Kneer, R. and Zhu, Y. G. (2004) Vacuolar compartmentalization: a second generation approach to engineering plants for phytoremediation. Trends in Plant Science 9: 7-9.

Tu, C. and Ma, L. Q. (2005) Effects of arsenic on concentration and distribution of nutrients in the fronds of the arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L.. Environment Pollution 135: 333-340.

Turkan, I., Bor, M., Ozdemir, F. and Koca, H. (2005) Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *Phaseolus acutifolia* gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. Plant Science 168: 223-231.

Uchida, A., Jagendorf, A. T. and Hibino, T. (2002) Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. Plant Science 163: 515-523.

Velikova, V., Yordanov, I. and Edreva, A. (2000) Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. Protective role of exogenous polyamines. Plant Science 151: 59-66.

Wang, Y. S. and Yang, Z. M. (2005) Nitric oxide reduces aluminum toxicity by preventing oxidative stress in the roots of *Cassia tora* L.. Plant and Cell Physiology 46: 1915-1923.

Wojasa, S., Clemensb, S., Skłodowska, A. and Antosiewicza, D. M. (2010) Arsenic response of AtPCS1- and CePCS-expressing plants: effects of external As (V) concentration on As-accumulation pattern and NPT metabolism. Journal of Plant Physiology 167(3): 169-175.

Xiong, J., Fu, G., Tao, L. and Zhu, C. H. (2010) Roles of nitric oxide in alleviating heavy metal toxicity in plants. Archives of Biochemistry and Biophysics 497: 13-20.

Zhang, Z., Pang, X., Duan, X., Ji, Z. L. and Jiang, Y. (2005) Role of peroxidase in anthocyanine degradation in litchi fruit pericarp. Food Chemistry 90: 47-52.

Zhu, S., Liu, M. and Zhou, J. (2006) Inhibition by nitric oxide of ethylene biosynthesis and lipoxygenase activity in peach fruit during storage. Postharvest Biological Technology 42: 41-48.

Investigation on the protective role of nitric oxide in alleviating arsenic acid toxicity in shoot and root of *Ocimum basilicum* L.

Saeid Zare Dehabadi [1], Zahra Asrar [1]*, Abdolhamid Namaki Shoushtari [1] and Shahram Pourseyedi [2]

[1] Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University, Kerman, Iran
[2] Department of Tillage, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University, Kerman, Iran

Abstract

Nitric oxide (NO) is a highly reactive free radical with a wide variety of physiological implications in plants. In this research, we investigated the protective effects of exogenous Sodium Nitroprusside (SNP) as a NO donor, against the toxicity caused by excess arsenic in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). Seedlings grown in a Hoagland nutrient solution were treated with SNP at 0 (control) and 150 µM and different concentration of arsenate at 0 (control), 150 and 300 µM. Arsenic treatment (specially in 300 µM) significantly induced accumulation of hydrogen peroxide (H_2O_2) significantly increase in serious lipid peroxidation, electrolyte leakage (EL) and decreased the growth and the biomass of basil. Application of SNP before arsenic stress resulted in alleviated arsenic-induced electrolyte leakage and malondiadehyde (MDA) content and increased proline and free amino acid contents in shoots and roots of sweet basil, compared with the control. On the whole, our results showed stronger arsenic toxicity in the root than in the shoot and nitric oxide probably, was increased tolerance capacity in basil due to production of osmoprotecting compounds such as proline, sugar and free amino acid. In addition, analysis of ICP-results indicated that, As translocation from root to shoot of *O. basilicum* was limited by SNP pretreatment which is very important for human health.

Key words: Arsenic acid, SNP, Nitric oxide, Growth, *Ocimum basilicum* L.

* Corresponding Author: zasrar@mail.uk.ac.ir