

پاسخ‌های فیزیولوژیکی گیاه گشنیز (Coriandrum sativum L.) به تری اکونتanol (TRIA) در شرایط سمیت آرسنیک

الهام اسدی کرم^۱، بتول کرامت^۱، زهرا اسرار^۱ و حسین مظفری^{*۲}

^۱ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ^۲ پژوهشکده علوم محیطی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۶/۱۵، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۴/۱۰/۰۶)

چکیده:

تری اکونتanol (TRIA) یک تنظیم کننده رشد گیاهی است که در کاهش اثرات بسیاری از تنش‌های غیرزیستی موثر است. به منظور بررسی اثر برهمکنش آرسنیک و تیمار TRIA بر برخی شاخص‌های فیزیولوژیکی گیاه گشنیز پژوهش حاضر براساس یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. فاکتورهای آزمایش شامل غلظت‌های مختلف TRIA (۰، ۵، ۱۰ و ۲۰ میکرومولار) و سطوح مختلف تنش ناشی از آرسنیک (۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار) بود. تیمار آرسنیک باعث تجمع معنی‌دار پراکسیدهیدروژن (H_2O_2)، افزایش معنی‌دار پراکسیداسیون لیپیدها، افزایش پرولین، قندهای محلول و افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گایاکول پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و کاهش محتوای کلروفیل *a* و *b* و کل در برگ گیاه شد. تیمار همزمان TRIA با آرسنیک میزان پراکسیدهیدروژن و پراکسیداسیون لیپیدها را کاهش داده همچنین باعث کاهش میزان پرولین و قندهای محلول در گیاهان شد درحالی که به افزایش معنی‌دار میزان کلروفیل *a* و *b* کل و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی در برگ گیاه منجر شد که این نتایج نشان دهنده نقش محسوس TRIA در حفاظت گیاه گشنیز در برابر سمیت فلز سنگین آرسنیک است که از طریق فعال کردن آنزیم‌های آنتی اکسیدانی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: تری اکونتanol، سمیت آرسنیک، گشنیز.

مقدمه:

ایجاد سمیت می‌گردد. اگرچه آلودگی آرسنیک بیشتر متعلق به کشورهای جنوب شرقی آسیا می‌باشد ولی در مناطقی از ایران نیز آلودگی خاک و آب به این آلاینده گزارش شده است (Karimi *et al.*, 2010). فلزات سنگین یا به طور مستقیم از طریق واکنش هابر- ویس 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،

آلودگی خاک‌ها با فلزات سنگین پدیده‌ای است که به طور گسترده در نتیجه فعالیت‌های بشر، در زمینه‌های کشاورزی و صنعت اتفاق می‌افتد (Sharma and Dubey, 2005). آرسنیک یکی از سموم مهم محیطی است که توانایی تجمع در 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

*نویسنده مسئول، نشانی پست الکترونیکی: mozafari.hossein@gmail.com

مواد و روش‌ها:

گیاه مورد مطالعه در این پژوهش، گیاه گشنیز (*Coriandrum sativum* L.) متعلق به خانواده چتریان می‌باشد. بذرها از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. برای این منظور ابتدا بذرهای یکسان با سدیم هیپوکلریت ۰/۵ درصد به مدت یک دقیقه ضدغوفونی شده و سپس دو بار با آب مقطر شسته شدند. برای کشت گیاه، از گلدانهای پلاستیکی با قطر ۱۲ سانتیمتر حاوی پرلیت استفاده شد. سپس بذرهای خیس خورده به گلدانها منتقل شدند. برای هر تیمار ۳ گلدان به عنوان ۳ تکرار در نظر گرفته شد. در هر گلدان یک بذر به عنوان یک نمونه کاشته شد. گلدانها پس از کشت در گلخانه، تحت شرایط نوری (۸:۱۶) (نور/تاریکی) با شدت نور حدود ۱۵۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه، رطوبت ۷۵ درصد و دمای روز/شب، ۲۰/۲۵ درجه سانتیگراد (تاریکی/نور) قرار گرفتند و به منظور تامین املاح مورد نیاز گیاه، گلدانها هفتاد ۳ مرتبه با محلول غذایی هوگلندهای ۱/۲ با pH تقریبی $\pm ۵/۷$ آبیاری شدند. پس از اینکه گیاهان به رشد کافی رسیدند (مرحله چهار برگی)، به مدت یک هفته به صورت یک روز در میان، تیمار آرسنیک شروع شد. به منظور تهیه محلول‌هایی با غلظت‌های ۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار آرسنیک، مقدار مناسبی از استوک میلی‌مولار آرسنیک از نمک آرسنیک اسید هیدروژن‌دی‌سدیم (Na_2HAsO_4) تهیه شده است به محلول هوگلندهای اضافه گردیده و pH محلول‌ها با استفاده از اسید-کلریدریک و سود یک میلی‌مولار تنظیم شد. محلول‌ها به صورت یک روز در میان به حجم ۵۰ میلی‌لیتر به گلدانها اضافه و در فواصل بین تیمارها به منظور مرطوب نگه داشتن خاک و ممانعت از تجمع بیش از حد نمک در گلدانها از آب مقطر استفاده می‌شد. محلول‌پاشی گیاهان توسط TRIA نیز با غلظت‌های ۰، ۵، ۱۰ و ۲۰ میکرومولار همزمان با تیمار آرسنیک شروع شد و به مدت یک هفته هر روز ادامه داشت و در نهایت پس از ۷ روز نمونه‌ها برداشت شدند.

اندازه‌گیری مقدار رنگیزه‌های فتوستزی شامل کلروفیل *a*، *b* و کاروتونوئیدها (کاروتونوئید و گزانوفیل) با استفاده از

بیرنگ شدن کلروپلاست‌ها و رنگدانه‌ها می‌گردد (Herbinger et al., 2002 ; Mittler, 2002) و اکتشهای تولید گونه‌های فعال اکسیژن و تولید رادیکال‌های آزاد، به ویژه در غشای کلروپلاست‌ها منجر به ایجاد تنفس اکسیداتیو می‌گردد (Morel, 2008).

تری‌اکونتانول (TRIA) یک الکل اولیه زنجیره طویل (C₃₀H₆₁OH) است که برای اولین بار توسط Ries و همکاران در سال ۱۹۷۷ در یونجه (*Medicago sativa* L.) کشف شد و به عنوان یک تنظیم‌کننده رشد گیاهی شناخته شد که در بهبود رشد و باردهی چندین گونه زراعی مانند برنج، گندم، ذرت، گوجه فرنگی، نخود سبز، بادام زمینی، قهوه و نعناع وحشی نقش دارد (Rise et al., 1977; Naeem et al., 2010, 2011). برای مثال در درخت گیاه فلفل هندی، کاربرد برگی TRIA در شرایط تنفس آب، محتوای روغن ضروری و بازده کل را افزایش داده است (Chatterjee, 1999). TRIA در تنظیم فرایندهای متابولیک مختلف گیاهان مانند افزایش نرخ فتوستز (Houtz et al., 1985) تقسیم سلولی (Hangarter et al., 1978) آنزیم‌ها (Naeem et al., 2011) و سیالیت و ویسکوزیتی غشاهای کلروپلاست و پروپلاست مزوپیل برگ (Ivanov and Angelov, 1997) نقش عمده‌ای بازی می‌کند. TRIA می‌تواند در طی مراحل مختلف رشد و در همه جنبه‌های رشد، رنگدانه‌های فتوستزی، مواد تغذیه‌ای برگها، پروتئین و محتوای کربوهیدرات‌ها، کیفیت و کمیت باردهی گیاهان، تاثیرات کارآمد و موثری را اعمال کند (Singh et al., 2009). افزایش محصول به علت افزایش سریع در سرعت آسیمیلاسیون خالص است که در گوجه فرنگی بعد از اسپری TRIA مشاهده گردیده است (Rise et al., 1977). کاربرد برگی TRIA در کاهش اثرات تنفسهای گوناگون غیرزیستی (خشکسالی، سیل، آب، شوری، فلزات سنگین، رطوبت اسیدی و تنفس سرما) گزارش شده است و با توجه به اینکه مطالعات اندکی در زمینه اثر این ترکیب بر تنفس فلزات سنگین صورت گرفته است. از این رو، در پژوهش حاضر به بررسی پاسخ فیزیولوژیکی گیاه گشنیز به TRIA در شرایط تنفس فلز سنگین آرسنیک پرداخته شد.

شاهد شده است. همچنین تیمار ۱۰ و ۲۰ میکرومولار TRIA به تنها، افزایش معنی‌دار بر میزان کاروتونئید گیاه گشینیز نسبت به گیاه شاهد داشت. تیمار توام گیاهان با TRIA و آرسنیک، مقدار کاروتونئیدها را در این گیاهان نسبت به گیاهان شاهد افزایش داده است (جدول ۲).

نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها، نشان داد که تیمار آرسنیک به تنها، باعث افزایش معنی‌دار میزان مالون دآلدئید و سایر آلدئیدها و پراکسیدهیدروژن در مقایسه با گیاه شاهد شده است. تیمار TRIA به تنها، در غلاظت ۵ میکرومولار، نیز افزایش معنی‌دار میزان مالون دآلدئید برگ را نسبت به گیاه شاهد نشان می‌دهد. تیمار ۱۰ میکرومولار TRIA با تیمار آرسنیک، باعث کاهش معنی‌دار میزان آن نسبت به گیاهان در شرایط تنش بدون تیمار TRIA گردید (شکل ۱). در بررسی تیمار توام، تیمارهای TRIA با آرسنیک باعث کاهش معنی‌دار مقدار سایر آلدئیدها در اندام هوایی نسبت به گیاهان شاهد گردید (شکل ۲). تیمار ۵ و ۱۰ میکرومولار TRIA باعث کاهش معنی‌دار پراکسیدهیدروژن در گیاهان تحت تیمار آرسنیک نسبت به شاهد شده است (شکل ۳).

در اندازه‌گیری مقدار پروولین برگ مشاهده شد که، تیمار گیاهان با آرسنیک باعث افزایش معنی‌دار مقدار پروولین در مقایسه با گیاهان شاهد گردید. تیمارهای ۵ و ۱۰ میکرومولار TRIA به تنها، تغییر معنی‌داری نسبت به شاهد نداشت. در گیاهان تحت تیمار آرسنیک، تیمار ۱۰ و ۲۰ میکرومولار TRIA باعث کاهش معنی‌دار محتوای پروولین برگ نسبت به گیاهان شاهد و گیاهان در شرایط تنش بدون کاربرد TRIA گردید (شکل ۴). نتایج نشان داد که، تنش آرسنیک و TRIA، هر کدام به تنها، باعث افزایش مقدار قند در برگ در مقایسه با نمونه شاهد شد. اما در تیمار توام، غلاظت‌های TRIA مقدار قند را در گیاهان تیمار شده با آرسنیک نسبت به شرایط تنش بدون تیمار TRIA کاهش داده است (شکل ۵). تیمار آرسنیک باعث افزایش فعالیت آنزیم CAT، GPX و APX در برگ گیاه نسبت به گیاهان شاهد شد. تیمار گیاهان با TRIA ۵ میکرومولار باعث افزایش معنی‌دار فعالیت کاتالاز در شرایط

روش Lichtenthaler (1987) انجام پذیرفت. اندازه‌گیری مالون دآلدئید (MDA) به روش Packer و Heath (1969) و سایر آلدئیدها به روش Meirs و همکاران (1992) انجام شد. برای اندازه‌گیری پروولین از روش Bates (1973) استفاده شد. محتوای قندهای محلول نمونه‌ها با استفاده از معرف آنترون و براساس روش Roe (1955) تعیین گردید. سنجش پراکسیدهیدروژن با استفاده از روش Velikova و همکاران (2000) انجام شد. سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) (EC 1.11.1.6) با استفاده از محاسبه کاهش جذب H_2O_2 (کاهش مقدار H_2O_2) در ۲۴۰ نانومتر و با روش Dhindsa و همکاران (1981) انجام شد. سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD) (EC 1.11.1.7) با استفاده از گایاکل و اندازه‌گیری میزان جذب تراگایاکل تشکیل شده از گایاکل در نتیجه فعالیت پراکسیداز، در ۴۷۰ نانومتر انجام گرفت. در این سنجش از روش Plewa و همکاران (1991) استفاده شد. سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) (EC1.11.1.1) با روش Asada و Nakano (1981) صورت گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری: این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار در هر تیمار انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرمافزار آماری SPSS نسخه ۱۸ و آزمون ANOVA صورت گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد و رسم نمودارها با نرمافزار Excel نسخه ۲۰۱۰ انجام پذیرفت.

نتایج:

براساس نتایج، تنش فلن سنگین آرسنیک باعث کاهش میزان رنگیزه‌های فتوستتری کلروفیل a و کلروفیل کل در مقایسه با گیاهان شاهد شد (جدول ۱). در حالی که تیمار غلاظت‌های ۵ و ۱۰ میکرومولار TRIA به تنها، باعث افزایش کلروفیل a ، کلروفیل کل گردید. کاربرد توام ۱۰ (۱۰ میکرومولار) و آرسنیک (۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار) موجب افزایش معنی‌دار کلروفیل a و کلروفیل کل در حد گیاه شاهد گردید. تیمار آرسنیک باعث افزایش محتوای کاروتونئیدها در مقایسه با گیاه

جدول ۱- تاثیر تری اکوتانول بر رنگیزه‌های فتوستزی در گیاه گشنیز تحت تنش آرسنیک.

کاروتنوئید	کلروفیل کل	b (میلی گرم بر گرم وزن تر)	a کلروفیل	آرسنیک	TRIA (میکرومولار)
۰/۵۴ ^c	۱۷/۱۱ ^{ab}	۷/۳۹ ^{ab}	۹/۷۲ ^b	۰	۰
۱/۸۳ ^b	۱۴/۲۹ ^c	۵/۰۲ ^{cd}	۹/۲۷ ^c	۱۵۰	۰
۱/۴۰ ^c	۱۳/۸۹ ^c	۵/۵۷ ^c	۸/۳۲ ^c	۳۰۰	۰
۰/۹۸ ^e	۱۸/۹۶ ^a	۷/۹۱ ^a	۱۱/۰۵ ^a	۰	۵
۱/۰۹ ^{de}	۸/۳۹ ^c	۲/۷۷ ^c	۵/۶۲ ^c	۱۵۰	۵
۱/۳۴ ^c	۹/۲۹ ^e	۲/۷۳ ^c	۷/۵۵ ^e	۳۰۰	۵
۲/۲۹ ^a	۱۶/۲۰ ^b	۵/۱۰ ^{cd}	۱۱/۱۱ ^a	۰	۱۰
۱/۷۹ ^b	۱۵/۶۵ ^b	۵/۵۴ ^c	۱۰/۰۷ ^{ab}	۱۵۰	۱۰
۱/۱۶ ^d	۱۴/۷۵ ^{bc}	۴/۱۶ ^{cd}	۱۰/۰۹ ^a	۳۰۰	۱۰
۱/۲۴ ^d	۱۴/۳۷ ^c	۵/۵۰ ^c	۸/۸۷ ^{bc}	۰	۲۰
۱/۰۸ ^{de}	۱۲/۹۷ ^d	۴/۹۹ ^{cd}	۷/۷۹ ^{cd}	۱۵۰	۲۰
۲/۲۶ ^a	۱۲/۱۵ ^d	۴/۸۶ ^{cd}	۷/۲۹ ^{cd}	۳۰۰	۲۰

حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

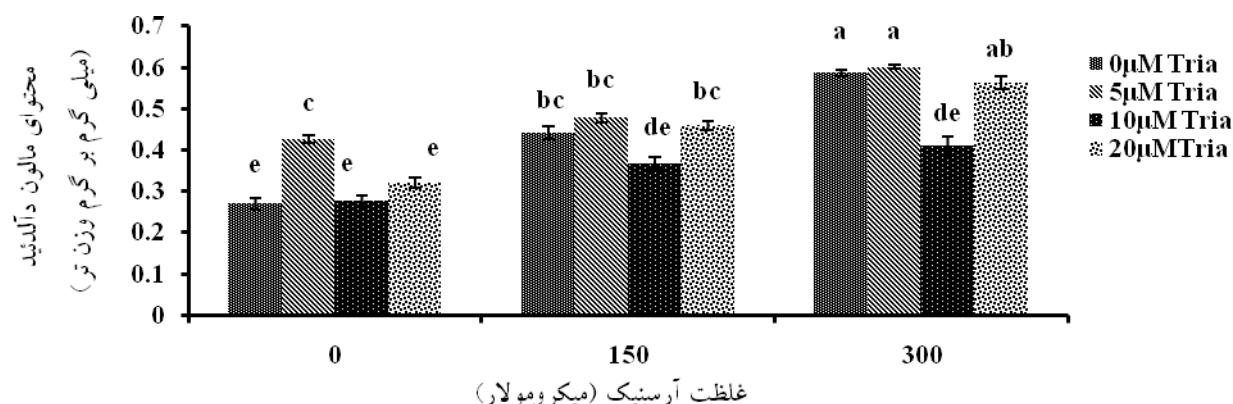
جدول ۲- تاثیر تری اکوتانول بر آنزیم‌های آنتی اکسیدان در گیاه گشنیز تحت تنش آرسنیک.

تیمار	کاتالاز (واحد بر میلی گرم پروتئین)	آسکوربیات پراکسیداز (واحد بر میلی گرم پروتئین)	گایاکول پراکسیداز (واحد بر میلی گرم پروتئین)
شاهد	۰/۳۷۸ ^f	۰/۴۳۰ ^c	۰/۰۹۰ ^{cd}
۵ TRIA میکرومولار	۱/۵۲۳ ^{cd}	۰/۸۴۳ ^{bc}	۰/۰۲۳ ^{ef}
۱۰ TRIA میکرومولار	۰/۵۰۲ ^f	۰/۳۵۸ ^c	۰/۰۰۰ ^f
۲۰ TRIA میکرومولار	۰/۳۶۳ ^f	۰/۴۳۱ ^c	۰/۰۳۹ ^{ef}
آرسنیک ۱۵۰ میکرو مولار	۱/۶۰۵ ^{bcd}	۱/۳۴۷ ^a	۰/۰۹۷ ^c
آرسنیک ۱۵۰	۲/۲۲۱ ^{ab}	۰/۷۰۱ ^{bc}	۰/۰۶۵ ^{cde}
آرسنیک ۱۵۰	۰/۳۱۲ ^f	۰/۲۹۲ ^c	۰/۰۲۴ ^{ef}
آرسنیک ۱۵۰ TRIA+	۰/۳۳۷ ^f	۰/۲۹۸ ^c	۰/۰۵۹ ^{cde}
آرسنیک ۳۰۰ میکرو مولار	۲/۶۲۱ ^a	۱/۶۹۲ ^a	۰/۲۱۳ ^a
آرسنیک ۳۰۰	۲/۶۷۴ ^a	۰/۷۲۲ ^{bc}	۰/۱۷۲ ^b
آرسنیک ۳۰۰ TRIA+	۱/۲۳۸ ^{de}	۰/۲۹۶ ^c	۰/۰۲۲ ^{ef}
آرسنیک ۳۰۰	۰/۳۲۴ ^{ef}	۰/۷۱۱ ^{bc}	۰/۰۶۱ ^{cde}

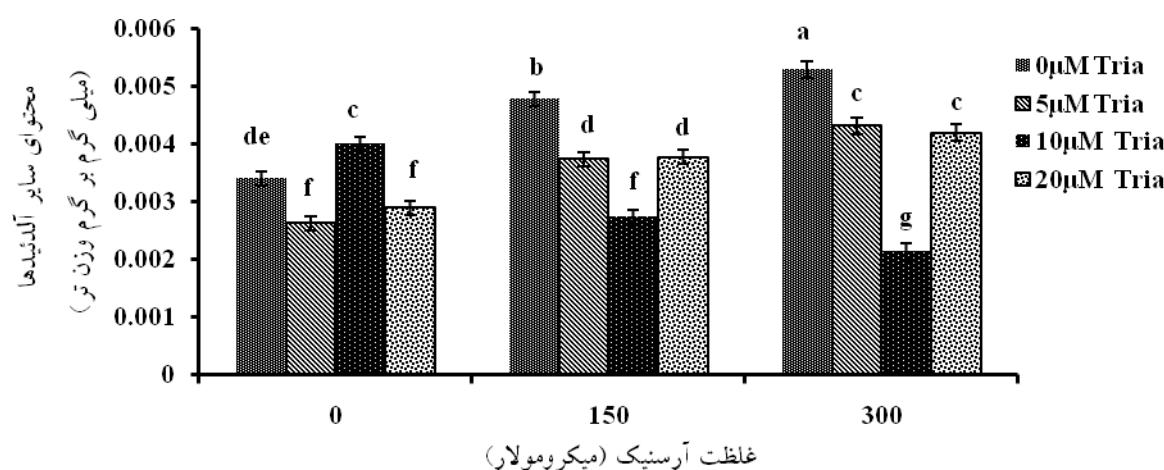
حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

در شرایط کنترل نشد. تیمار گیاهان با TRIA ۵، ۱۰ و ۲۰ میکرومولار باعث کاهش فعالیت APX نسبت به شرایط تنش

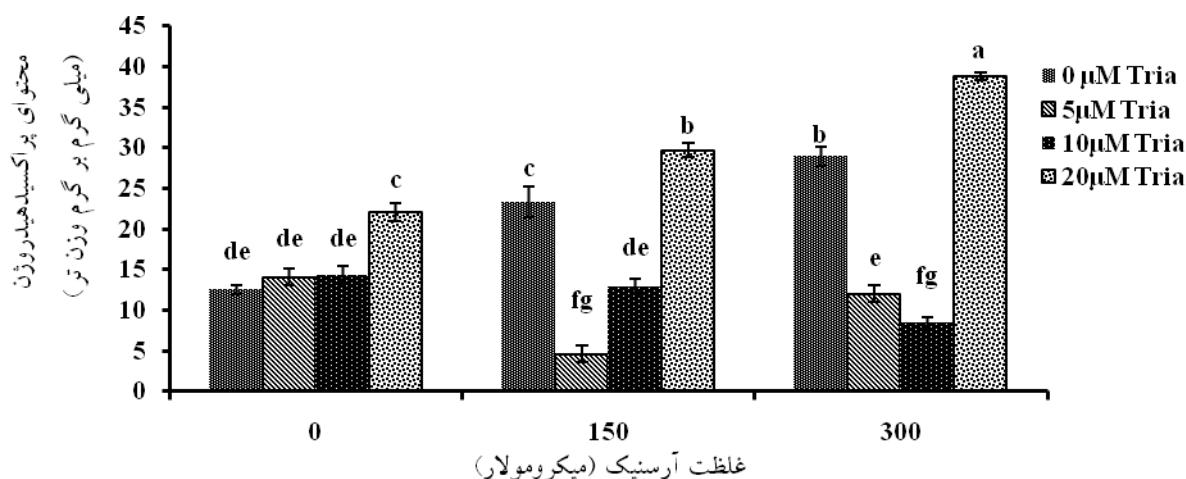
تشن ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار آرسنیک شد. استفاده از تیمار TRIA در برگ، باعث تغییر معنی‌داری در فعالیت آنزیم APX



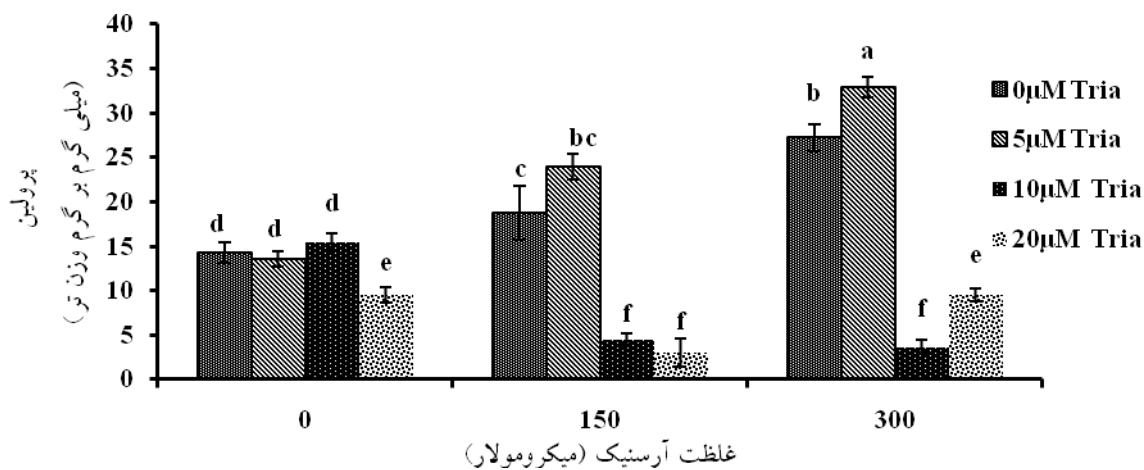
شکل ۱- اثر متقابل تریاکونتانول و آرسنیک، بر میانگین محتوای مالون دآلدهید در اندام هوایی گیاه گشنیز. حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.



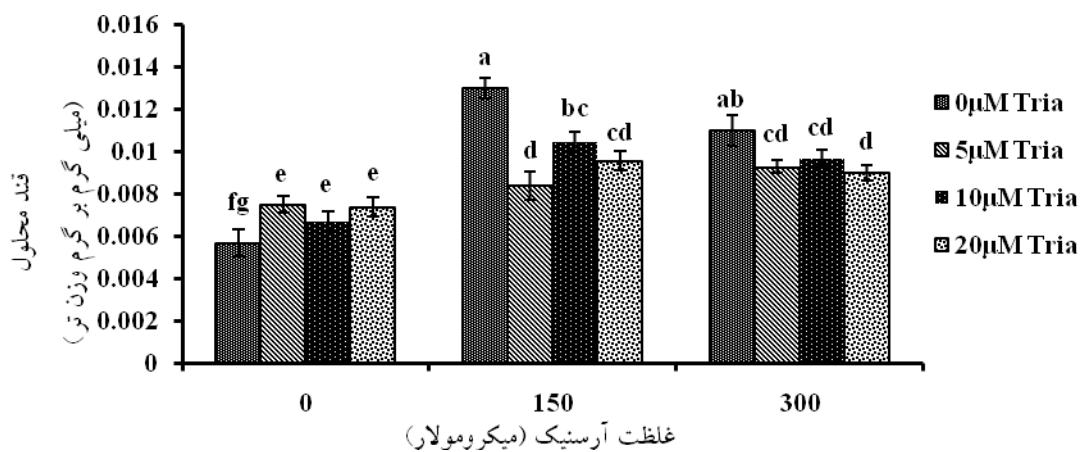
شکل ۲- اثر متقابل تریاکونتانول و آرسنیک، بر میانگین محتوای سایر دآلدهیدها در اندام هوایی گیاه گشنیز. حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.



شکل ۳- اثر متقابل تریاکونتانول و آرسنیک، بر میانگین محتوای پراکسیدهیدروژن در اندام هوایی گیاه گشنیز. حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.



شکل ۴- اثر متقابل تریاکونتانول و آرسنیک، بر میانگین محتوای پرولین در اندام هوایی گیاه گشتنیز. حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن می باشد.



شکل ۵- اثر متقابل تریاکونتانول و آرسنیک، بر میانگین میزان قندهای محلول در اندام هوایی گیاه گشتنیز. حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن می باشد.

Shaibur *et al.*, 2006). در این پژوهش تیمار آرسنیک میزان کلروفیل را کاهش داد در حالی که تیمار ۱۰ میکرومولار TRIA باعث افزایش این میزان در شرایط سمیت آرسنیک شد (جدول ۱). گزارشات متعددی مبنی بر اثر منفی آرسنیک بر محتوای کلروفیل و کاروتینوئید وجود دارد (Shaibur *et al.*, 2008) کاهش مقدار کلروفیل و کاروتینوئید در اثر تیمار آرسنیک در گیاه جو Stancheva *et al.*, (Stoeva and Bineva, 2003)، برنج (Chun-Xi *et al.*, 2007)، گندم (Chun-Xi *et al.*, 2007) و سورگوم (1999) گزارش شده است. Chun-Xi *et al.*, 2007) گزارش شده است. همکاران (۲۰۰۷) معتقدند که کاهش کلروفیل عمدتاً به دلیل

بدون تیمار TRIA گردید. تیمار TRIA به تنها یکی، نیز باعث کاهش معنی داری GPX در گیاهان شاهد شد. تیمار توام آرسنیک ۳۰۰ میکرومولار و TRIA ۵ میکرومولار باعث افزایش فعالیت آنزیم نسبت به گیاهان شاهد گردید (جدول ۲).

بحث:

فتوصیت یکی از مهمترین فرایندهای فیزیولوژیکی گیاه می باشد، که تحت تاثیر تنفس های محیطی مانند تنفس فلزات سنگین قرار می گیرد. زرد شدن برگ ها معمولاً به عنوان یکی از علائم اصلی سمیت فلزات سنگین در گیاهان مطرح می شود

2008 *al.*) گزارش شده است. در این پژوهش تیمار آرسنیک میزان مالون دی آلدھید را افزایش داد که نشان می دهد که افزایش گونه های فعال اکسیژن در تیمار آرسنیک تا حدی زیاد بوده است که حذف و یا جاروب کردن آنها با سیستم های دفاع آنزیمی و غیر آنزیمی خارج از توان گیاه بوده است و موجب تنش اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپید است. برخی از پژوهشگران بر این عقیده اند که آرسنیک با اختلال در متابولیسم فسفر و کاهش فعالیت برخی آنزیم های حیاتی باعث افزایش تجمع گونه های فعال اکسیژن از جمله H_2O_2 در گیاه می شود (TRIA, 2009). گزارش شده است که کاربرد برگی *Singh et al.*, 2009) پراکسیداسیون لیپید غشا شامل تغییر در ترکیب شیمیابی غشا به وسیله تفاوت در سازماندهی لیپید غشا و بیان پایین مهارکننده های پروتئیناز را مهار می کند (Ramanarayanan *et al.*, 2000). کاربرد برگی TRIA همچنین تنش اکسیداتیو را به وسیله کاهش نفوذپذیری غشاء، کاهش محتوای مالون ROS (محصولی از پر اکسیدان چربی) و H_2O_2 (یک دآلدھید) پایدار در گیاهان) بافت هایی از هر دو گونه گندم کاهش می دهد. TRIA تخریب پراکسیداسیون آنزیمی و غیر آنزیمی (Ramanarayanan *et al.*, 2000) لیپید های غشا را مهار می کند (برای مثال گزارش شده است که تیمار بذر با TRIA فعالیت آنزیم آنتی اکسیدان کلیدی، پراکسیداز، را که در کاهش سطح هیدروژن- پراکسید نقش دارد، افزایش می دهد (Perveen *et al.*, 2014). در این پژوهش تیمار آرسنیک فعالیت آنزیم های CAT، GPX و APX را نسبت به گیاهان شاهد افزایش داده است (جدول ۲) با این وجود چنین به نظر می رسد که این افزایش برای جبران افزایش H_2O_2 و تنش اکسیداتیو ناشی از تجمع گونه های فعال اکسیژن در اثر سمیت آرسنیک کافی نبوده و میزان تولید گونه های فعال اکسیژن از ظرفیت آنتی اکسیدانی گیاهان بیشتر بوده است. افزایش فعالیت GPX در اثر تیمار با شبه فلز آرسنات در گیاه برنج گزارش شده است (Singh *et al.*, 2009). تحریک فعالیت CAT توسط آرسنیک در برگ های گیاه خردل هندی (Khan *et al.*, 2009) و برنج (Singh *et al.*, 2009) گزارش شده است. تیمار گیاهان با غلظت ۵ میکرومولار TRIA فعالیت

تخرب ساختمان کلروپلاست و دستگاه فتوستتری، فتوکسیداسیون کلروفیل ها، تخریب پیش ماده های سنتز کلروفیل و یا ممانعت از بیوستتر کلروفیل است. آرسنیک دارای یک اثر مهاری وابسته به غلظت، بر سنتز کلروفیل می باشد. این نظریه بیان می کند که سیستم سنتز و تجزیه کلروفیل توسط غلظت های بالای آرسنیک تحت تاثیر قرار می گیرد (Chun-Xi *et al.*, 2007) در رابطه با اثر TRIA بر محتوای کلروفیل گزارش شده که کاربرد برگی TRIA، محتوای کلروفیل را در برگ های تربچه (Krishnan and Ranjitha Zhou *et al.*, 1994) گیاهان سویا (Perveen *et al.*, 2010) و گیاهان گندم (Kumari, 2008) افزایش داد. نقش اصلی TRIA، تنظیم فتوستتر است بطوریکه سرعت آسیمیلاسیون خالص CO_2 را توسط بالا بردن فعالیت ویژه آنزیم روپیسکو، افزایش می دهد (Erikson *et al.*, 1981)، همچنین بر کمپلکس جمع کننده نور در فتوسیستم یک و دو اثر مثبت دارد (Moorthy and Kathiresan, 1993) و بیان ژن های درگیر در فرایند فتوستتر را افزایش می دهد و بیان ژن های مربوط به تنش را کم می کند (Chen *et al.*, 2002).

بعضی گزارش ها نشان می دهد که اسپری برگی TRIA اثرات تنش های گوناگون غیرزیستی (خشکسالی، سیل، آب، شوری، فلزات سنگین، رطوبت اسیدی و تنش سرما) در رنگدانه های کلروفیل، فتوستتر، هدایت روزنده ای، فلورسانس کلروفیل (کارآمدی PSII)، خاموشی فتوشیمیابی، سرعت انتقال الکترونی، کمپلکس آزاد کننده O_2 ، فعالیت زیر واحد کوچک و Rajasekaran and Blake, 1999; Borthakur and Blake, 1999; Muthuchelian *et al.*, 2003; Borowski and Borowski, 2009) را کاهش می دهد.

محتوای مالون دی آلدھید و پراکسیدهیدروژن، به عنوان دو شاخص تنش اکسیداتیو، در اندام هوایی گیاه گشتنیز با افزایش غلظت آرسنیک در محلول غذایی افزایش معنی داری داشت، در حالی که در نمونه های تیمار شده با TRIA مقدار آنها در برگ به طور معنی داری کاهش یافت (شکل ۱ و ۳). القای تنش اکسیداتیو و افزایش مالون دآلدھید در اثر تیمار آرسنیک در گیاهان ذرت (Stoeva *et al.*, 2004)، برنج (Vazquez *et al.*, 2007) و لویا (Chun-Xi *et al.*, 2007) گندم (2009)

است (زارع و همکاران، ۱۳۹۲). همچنین گزارش شده که تیمار TRIA باعث کاهش محتوای پرولین در گیاه سویا تحت تنش شوری شده است (Krishnan and Kumari, 2008). نتایج به دست آمده در این بررسی نشان می‌دهد که TRIA می‌تواند از طریق تاثیر بر کاهش تنش ناشی از فلز سنگین بر محتوای پرولین اثر گذارد. در این پژوهش تیمار آرسنیک، میزان قند محلول در گیاه را افزایش داد همچنین تیمارهای ۵ و ۱۰ میکرومولار TRIA در غلظت ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار آرسنیک باعث افزایش محتوای قند نسبت به نمونه شاهد گردید (شکل ۵). در مورد اثر تنش فلز سنگین گزارش شده است که در گیاه‌چهای *Musa acuminata*, با افزایش غلظت مس محتوای قند در اندام هوایی گیاهان تحت تیمار افزایش یافته است که این احتمال می‌دهد که تنش ناشی از مس را خشی می‌کند (Deo and Nayak, 2011). همچنین در گیاهان ریحان تحت تنش آرسنیک افزایش در میزان قندهای محلول و احیا کننده مشاهده شده است (زارع و همکاران، ۱۳۹۲). نتایج پژوهش Jha و Dubey (۲۰۰۴) نشان داد که، در گیاه برنج آرسنیک تبدیل قندهای غیر احیایی مانند سوکروز به قندهای احیایی مانند گلوكز و فروکتوز را افزایش داده و آنزیم می‌سازند. همچنین فعالیت آنزیم‌های 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 (Jha and Dubey, 2004), که می‌تواند توجیهی بر افزایش قندهای محلول در اثر آرسنیک در پژوهش حاضر باشد. در زمینه اثر TRIA بر محتوای قند گزارش شده است که کاربرد TRIA در گیاه بادام زمینی باعث افزایش محتوای کاروفیل و میزان قندهای محلول گردید (Verma et al., 2011). تحقیقات زیادی نقش مثبت TRIA در افزایش رشد، مخصوصاً توسترز، تثبیت نیتروژن، فعالیت آنزیم‌ها، اسیدهای آمینه آزاد، قندهای محلول گیاهان را گزارش می‌دهد؛ (Borowski et al., 2000;

آنزم GPX و CAT را در شرایط تنش آرسنیک به طور معنی داری نسبت به گیاهان تیمار نشده افزایش داد (جدول ۲). گزارشات متعددی در مورد افزایش فعالیت CAT و GPX در گیاهان تیمار شده با TRIA تحت تنش‌های مختلف وجود دارد. گزارش شده است که تیمار TRIA در گیاهان ریحان تحت تنش سرما باعث افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز و در نتیجه مقاومت این گیاهان به تنش سرما شده است (Borowski and Blamowski, 2009). گدم با TRIA باعث افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در این گیاهان تحت تنش شوری شده است (Perveen et al., 2010). تیمار TRIA فعالیت CAT و APX را در گیاه بادام زمینی افزایش داده است (Verma et al., 2011). در این پژوهش تیمار ۵ و ۱۰ میکرومولار TRIA محتوی پراکسید هیدروژن را به طور معنی داری در گیاهان تحت تنش کاهش داد بنابراین احتمالاً TRIA از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیداتیو گیاه را در مقابل آسیب اکسیداتیو ناشی از سمیت آرسنیک محافظت می‌نماید. یکی از راههای مقابله با تنش‌های محیطی نظیر شوری و خشکی سنتز ترکیبات سازگار و محافظ اسمزی می‌باشد که پرولین از جمله این ترکیبات می‌باشد. پرولین در حفظ تعادل آب، حفظ ثبات پروتئین‌ها، حفظ ساختار سه بعدی پروتئین‌ها و آنزیم‌ها، تثبیت کردن غشاها و دستگاه سنتز پروتئین، منبع ذخیره کربن و نیتروژن برای رشد بعد از رفع تنش، کاهش خطرات حاصل از تولید ROS، جاروب کردن رادیکال‌های هیدروکسیل، خاموش کردن اکسیژن یکتائی و تنظیم pH سلولی نقش دارد (Verbuggen and Hermans, 2008). گیاهان برنج ترانسژنی که مقدار پرولین بیشتری را تجمع می‌دادند در شرایط تنش دارای رشد بهتری بودند (Su and Wu, 2004). نتایج حاصل از سنجش پرولین در گیاه گشنیز نشان داد که تیمار آرسنیک باعث افزایش مقدار پرولین شد در حالی که کاربرد ۵ TRIA ۱۰ میکرومولار تا حد زیادی میزان پرولین را در اندام هوایی گیاه کاهش داد (شکل ۴). مشاهده شده است که میزان پرولین در برگ و ریشه گیاه ریحان تحت تنش آرسنیک افزایش یافته

نشان می‌دهد که، تیمار آرسنیک باعث ایجاد سمیت در گیاه گشینیز شد در حالیکه کاربرد برگی TRIA باعث تخفیف میزان تنش در گیاهان تحت سمیت آرسنیک گردید. بررسی‌ها نشان داد که TRIA (به ویژه غلظت پایین ۵ و ۱۰ میکرومولار) با فعال کردن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و از طریق حفظ تمامیت غشاها زیستی، کاهش محتوای گونه‌های فعال اکسیژن و تغییر متابولیسم برخی ترکیبات سلولی، آستانه تحمل گیاه را در برابر آرسنیک اسید افزایش می‌دهد.

Idrees *et al.* 2010; Naeem *et al.*, 2010, 2011) بنابراین TRIA به دلیل افزایش در میزان فتوستتر و فرآوردهای فتوستتری می‌تواند باعث افزایش محتوای قندهای محلول در گیاهان تحت تنش آرسنیک شود و می‌توان نقش TRIA را در ایجاد مقاومت گیاه در برابر استرس موثر دانست.

نتیجه‌گیری کلی:

نتایج حاصل از پارامترهای اندازه‌گیری شده در این پژوهش

منابع:

- زارع ده آبادی، س.، اسرار، ز.، شوشتري، ع. و پورسيدي، ش. (۱۳۹۲) بررسی نقش حفاظتی نيتريک اكسيد در کاهش آثار سمیت آرسنیک اسید در اندام هوایی و ریشه گیاه ریحان سبز (*Ocimum basilicum L.*). زیست‌شناسی گیاهی ایران ۱۸: ۱۴-۱۸.
- Bates, L. S. (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil* 39: 205-207.
- Borowski E, Blamowski ZK, Michalek W. (2000) Effects of tomatex/triacontanol on chlorophyll fluorescence and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) yields. *Acta Physiologiae Plantarum* 22:271274.
- Borowski, E. and Blamowski, Z. K. (2009) The effects of triacontanol 'TRIA' and Asahi SL on the development and metabolic activity of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) plants treated with chilling. *Acta Horticulturae* 21/1:3948.
- Chatterjee, S. K. (1999). Water stress effects on betelvine (*Piper betle*) and its alleviation by n-triacontanol. *Acta Horticulturae* 1:502-512.
- Chen, X., Yuan, H., Chen, R., Zhu, L., Du, B., Weng, Q. and He, G. (2002) Isolation and characterization of triacontanol regulated genes in rice (*Oryza sativa* L.): Possible role of triacontanol as a plant growth stimulator. *Plant Cell Physiology* 43:869876.
- Chun-xi, L., Shu-li, F., Yan, S.H., Li-na, J., Xu-yang, L. and Xiao-li, H. (2007) Effects of arsenic on seed germination and physiological activities of wheat seedlings. *Journal Environ Science* 19: 725-732.
- Deo, B. and Nayak, P. K. (2011) Study of copper phytotoxicity on in vitro culture of *Musa acuminata* cv. 'Bantala'. *Journal of Agricultural Biotechnology and Sustainable Development* 3: 136-140.
- Dhindsa, R.S., Plumb-Dhindsa, P. and Thrope, T.A. (1981) Leaf Senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid per oxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Experimental Botany* 32: 43-101.
- Eriksen, A. B. Selldén, G. Skogen, D. and Nilsen, S. (1981) "Comparative analyses of the effect of triacontanol on photosynthesis, photorespiration and growth of tomato (C3-plant) and maize (C4-plant). *Planta* 152:44-49.
- Hangarter, R. and Ries, S. (1978) Effect of triacontanol on plant cell cultures *in vitro*. *Plant Physiology* 61: 855-857.
- 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.
- 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.
- Houtz, R. L., Ries, S. K. and Tolbert, N. E. (1985) Effect of triacontanol on Chlamydomonas I. Stimulation of growth and photosynthetic CO₂ assimilation. *Plant Physiology* 79:357-364.
- Idrees, M., Khan, M. M. A., Aftab, T. and Naeem, M. (2010) Synergistic effects of gibberellic acid and triacontanol on growth, physiology, enzyme activities and essential oil content of *Coriandrum sativum* L. *The Asian Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology* 4:24-29.
- Ivanov, A. G. and Angelov, M. N. (1997) Photosynthesis response to triacontanol correlates with increased dynamics of mesophyll protoplast and chloroplast membranes. *Plant Growth Regulation* 21:145-152.
- Jha, A. B. and Dubey, R. S. (2004) Carbohydrate metabolism in growing rice seedling under arsenic toxicity. *Plant Physiology* 161: 867-872.
- 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.

- Khan, I., Ahmad, A. and Iqbal, M. (2009) Modulation of antioxidant defence system for arsenic detoxification in Indian mustard. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72: 626-634.
- Krishnan, R. R. and Kumari, B. D. R. (2008) Effect of n-triacontanol on the growth of salt stressed soyabean plants. *Bioscience* 19: 53-56.
- Lichenthaler, H. K. (1987) Chlorophyll and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Method Enzymol* 148: 350-382.
- Meirs, S., Philosophhadas, S. and Aharoni, N. (1992) Ethylene increased accumulation of fluorescent lipid peroxidation products detected during senescence of parsley by a newly developed method. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 117:128-132.
- 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.
- Moorthy, P. and Kathiresan, K. (1993) "Physiological responses of mangrove seedling to triacontanol," *Biologia Plantarum* 35: 577-581.
- Morel, F. M. M. (2008) The co-evolution of phytoplankton and trace element cycle in the oceans. *Geobiology* 6: 318-324.
- Muthuchelian, K., Velayutham, M. and Nedunchezhian, N. (2003) Ameliorating effect of triacontanol on acidic mistreated *Erythrina variegata* seedlings changes in growth and photosynthetic activities. *Plant Science* 165:1253-1257.
- Naeem, M., Idrees, M., Aftab, T., Khan, M., Moinuddin, M. A. (2010) Changes in photosynthesis, enzyme activities and production of anthraquinone and sennoside content of coffee senna (*Senna occidentalis* L.) by triacontanol. *International Journal Plant Development Biology* 4:53-59.
- Naeem, M., Khan, M., Moinuddin, M. A., Idrees, M. and Aftab, T. (2011) Triacontanol-mediated regulation of growth and other physiological attributes, active constituents and yield of *Mentha arvensis* L. *Plant Growth Regulation* 65:195-206.
- Nakano, Y. and Asado, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology* 22: 867-880.
- Perveen, S., Shahbaz, M. and Ashraf, M. (2010) Regulation in gas exchange and quantum yield of photosystem II (PS II) in salt-stressed and non-stressed wheat plants raised from seed treated with Triacontanol. *Pakistan Journal of Botany* 42:3073-3081.
- Perveen, S., Shahbaz, M. and Ashraf, M. (2014) Triacontanol-induced changes in growth, yield, leaf water relations, oxidative defense system, minerals, and some key osmoprotectants in *Triticum aestivum* under saline conditions. *Turkish Journal of Botany* 38: 896-913.
- Plewa, M. J., Smith, S. R. and Wanger, E. D. (1991) Diethyldithiocarbamate suppresses the plant activation of aromatic amines into mutagens by inhibiting tobacco cell peroxidase. *Mutation Research* 247: 57-64.
- Rajasekaran, L. R. and Blake, T. J. (1999) New plant growth regulators protect photosynthesis and enhance growth under drought of Jack Pine seedlings. *Plant Growth Regulation* 18:175-181.
- Ramanarayanan, K., Bhat, A., Shripathi, V., Sivakumar Swamy, G. and Sankara Rao, K. (2000) Triacontanol inhibits both enzymatic and nonenzymatic lipid peroxidation. *Phytochemistry* 55: 59-66.
- Ries, S. K., Wert, V. F., Sweeley, C. C. and Leavitt, R. A. (1977) Triacontanol: a new natural occurring plant growth regulator. *Science* 195:1339-1341.
- Robe, E. (1990) The functional significance of the accumulation of nitrogen-containing compounds. *Horticultural Sciences* 65:231-243.
- Roe, J. H. (1955) The determination of sugar in blood and spinal fluid with anthrone reagent. *Biological Chemistry* 212: 335-343.
- Roy, P. and Saha, A. (2002) Metabolism and Toxicity of Arsenic: A Human Carcinogen. *Current Science* 82: 38-45.
- Shaibur, M. R., Kitajima, N., Sugawara, R., Kondo, T., Alam, Sh., Imamul-Huq, S. M. and Kawai, Sh. (2008) Critical toxicity level of arsenic and elemental composition of arsenic-Induced chlorosis in hydroponic sorghum. *Water Air and Soil Pollution* 191: 279-292.
- Shaibur, M. R., Kitajima, N., Sugawara, R., Kondo, T., Imamul-Huq, S.M. and Kawai, S. (2006) Physiological and mineralogical properties of arsenic-induced chlorosis in rice seedlings grown hydroponically. *Soil Science and Plant Nutrition* 52: 691-700.
- Sharma, P. and Dubey, R. S. (2005) Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Growth Regulation* 46: 209-221.
- 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.
- Stancheva, I., Kaloanova, N. and Atanasova, E. (1999) Effect of copper and arsenic on the yield and plastid pigment content of rice inoculated with *Azospirillum Brasiliense*. Soil Science 39: 140-143.
- Stoeva, N., Berova, M. and Zlatez, Z. (2004) Physiological response of maize to arsenic contamination. Planta 47: 449-452.
- Stoeva, N. and Bineva, T. (2003) Oxidative changes and photosynthesis in oat plants grown in As-contaminated soil. Bulgarian Journal Plant physiology 29: 87-95.
- Su, J. and Wu, R. (2004) Stress-induced synthesis of proline in transgenic rice confer faster growth under stress conditions than with constitutive synthesis. Plant Sciences 166: 941-947.
- Vazquez, S., Esteban, E. and Carpena, R. O. (2008) Evolution of arsenate toxicity in nodulated white lupine in a long-term culture. Journal Agriculture and Food Science 56: 8580-8587.
- 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.
- Verbruggen, N. and Hermans, C. (2008) Proline-accumulation in plants: a review. Amino Acids 35: 753-759.
- Verma, A., Malik, Ch. P., Gupta, V. K. and Bajaj, B. K. (2011) Effects of *in vitro* triacontanol on growth, antioxidant enzymes, and photosynthetic characteristics in *Arachis hypogaea* L. Brazilian Journal of Plant Physiology 23: 271-277.
- Zhou, W., Tao, S. and Zhao, D. (1994) Physiologic regulation of mixtalol in rape senescence and its yield. Plant Growth Regulation 14: 37-40.

Plant physiological responses of coriander (*Coriandrum sativum L.*) to Triacontanol (TRIA), in the toxicity conditions of arsenic

Elham Asadi Karam¹, Batool Keramat¹, Zahra Asrar¹ and Hossein Mozafari^{2*}

¹ Department of Biology, Shahid Bahonar university of Kerman

²Department of Ecology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran

(Received: 6 September 2015, Accepted: 27 December 2015)

Abstract:

Triacontanol (TRIA), is a plant growth regulator which is effective in reducing the effects of abiotic stresses. In order to investigate the effects of interaction between arsenic and TRIA treatment on some physiological indicators of coriander the present study was carried out based on a factorial experiment in a completely randomized design with three replications. Experimental factors included of experiment include in different concentrations of TRIA (0, 5, 10 and 20 μM) and different levels of oxidative stress induced by arsenic (150 and 300 μM). Arsenic treatment caused a significant accumulation of hydrogenperoxide (H_2O_2), a significant increasing in lipid peroxidation, increasing of proline, soluble sugars and enhancing the activity of antioxidant enzymes, GPX, APX and reduction the content of chlorophyll *a*, *b* and total chlorophyll in leaf plant. Simultaneous treatment of TRIA and arsenic, decreased the amount of hydrogen peroxide and lipid peroxidation, and also reduced the amount of proline and soluble sugars in the plant, while it resulted in increasing the amount of chlorophyll *a*, *b*, total chlorophyll and the activity of antioxidant enzymes in the plant and these results showed the significant role of TRIA coriander plant in protection against heavy metal arsenic, which was through the activation of antioxidant enzymes.

Keywords: Arsenic Toxicity, Triacontanol, Coriander.

*corresponding author, Email: Mozafari.hossein@gmail.com