



بررسی مقایسه‌ای تاثیر فناترن و پیرن بر جوانه‌زنی، رشد و فعالیت آنزیم‌های پاداکساینده گیاهچه‌های گندم زراعی (*Triticum aestivum* L.)

ایوب سبحانی^۱، سید یحیی صالحی لیسار^۲، علی موافقی^۳

دریافت: ۹۶/۲/۲۵ پذیرش: ۹۶/۶/۲۴

چکیده

هیدروکربنهای آروماتیک چند حلقه‌ای (PAHs) گروه مهمی از آلاینده‌های آلی می‌باشند که گیاهان را از جنبه‌های مختلف رشد و نمو تحت تاثیر قرار می‌دهند. از این رو هدف این مطالعه ارزیابی جوانه‌زنی، رشد و برخی پاسخ‌های فیزیولوژیک گیاهچه‌های گندم زراعی به دو ترکیب از این گروه بنام‌های فناترن و پیرن می‌باشد. دانه‌های گندم بصورت هیدروپونیک کشت داده شدند و به مدت ۷ روز تحت تیمار غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومول از این دو ترکیب قرار گرفتند. محتوای رنگیزهای فتوسنتزی، مالون دی آلدئید و پراکسید هیدروژن و همچنین فعالیت آنزیمهای کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POD)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و آسکوربات پراکسیداز (APX) توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. هر دو آلاینده جوانه‌زنی، رشد، تولید بیومس و محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی را کاهش دادند، اما تاثیر فناترن بیشتر از پیرن بود. محتوای مالون دی آلدئید و پراکسید هیدروژن با افزایش غلظت تیمارها افزایش پیدا کرد. بجز آنزیم کاتالاز، فعالیت سه آنزیم دیگر با افزایش غلظت آلاینده‌ها بطور معنی‌داری کاهش یافت. این نتایج نشان می‌دهد که به احتمال زیاد تنش اکسیداتیو عامل کاهش رشد و اثرات زیانبار PAHs در خاک‌های آلوده به این مواد می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: گندم، هیدروکربنهای آروماتیک چند حلقه‌ای، تنش اکسیداتیو، اثرات فیزیولوژیک

سبحانی، ا.، س.ی. صالحی لیسار، و ع. موافقی. ۱۳۹۸. بررسی مقایسه‌ای تاثیر فناترن و پیرن بر جوانه‌زنی، رشد و فعالیت آنزیم‌های پاداکساینده گیاهچه‌های گندم زراعی (*Triticum aestivum* L.). مجله اکوفیزیولوژی گیاهی. ۳۹: ۱۳۷-۱۲۶.

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۲- دانشیار، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران- مسئول مکاتبات. y_salehi@tabrizu.ac.ir

۳- استاد، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

مقدمه

سازی PAHs به محیط زیست در نتیجه فعالیت‌های بشری، باعث آسیب‌هایی به تنوع گونه‌های گیاهی و به تبع آن محصولات کشاورزی در آینده خواهد شد (کومه روا و همکاران، ۱۹۹۷)، بنابراین فهم مکانیسم‌های تأثیر این مواد بر رشد و نمو گیاهان مهم خواهد بود.

از اینرو، هدف از این مطالعه ارزیابی اثرات فناترن و پیرن به عنوان دو ترکیب فراوان از PAHs در طبیعت با ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی متفاوت بر جوانه‌زنی دانه‌ها، مراحل اولیه رشد و فعالیت آنزیم‌های پاداکساینده گیاه گندم زراعی (*Triticum aestivum L.*) می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه محلول غذایی

از محلول غذایی ناپ ($\text{KNO}_3(0.2)$, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2(0.8)$, $\text{KH}_2\text{PO}_4(0.2)$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}(0.2)$, $\text{FeSO}_4(0.0049)$ gr lit^{-1}) برای تغذیه گیاهچه‌ها استفاده شد (آکروانته، ۱۹۸۵). فناترن و پیرن (Merck, Schuchardt, Germany) جهت تهیه محلولهای استوک ۱۰ میلی مولار، در استون حل گردیدند. محلولهای استوک جهت تهیه غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومول بر لیتر از هر کدام بصورت جداگانه به محلول ۱۰٪ ناپ اضافه گردیدند. دو گروه محلول شاهد، یکی بدون استون و دیگری حاوی همان غلظت استون بکار رفته برای تهیه تیمارهای PAHs، به منظور ارزیابی اثرات احتمالی استون بر گیاهچه‌های گندم تهیه گردید. هر چند قبلاً گزارش شده که این غلظت بکار رفته از استون تأثیر معنی‌داری بر جوانه‌زنی و سایر پارامترهای رشدی گیاهان ندارد (تومر و جاجو، ۲۰۱۳؛ کومه روا و همکاران، ۱۹۹۶)

جوانه‌زنی دانه‌ها و کشت گیاهچه‌ها

آزمایش در سال ۱۳۹۵ در گلخانه گروه زیست‌شناسی دانشگاه تبریز در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار برای هر تیمار انجام شد. دانه‌های گندم رقم پیشگام از مرکز جهاد کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان شرقی (تبریز) تهیه و تا زمان کشت در دمای 4°C نگهداری شدند. دانه‌ها توسط محلول هیپوکلریت سدیم ۵٪ به مدت ۵ دقیقه ضد عفونی گردیده و سپس بطور کامل توسط آب مقطر شستشو داده شدند. دانه‌های ضد عفونی شده به تعداد ۱۵ عدد در پتری دیش‌هایی به قطر ۱۲cm که حاوی دو لایه کاغذ واتمن بودند، با فاصله منظم و یکسان چیده شدند و ۱۲ میلی لیتر محلول ناپ بدون استون (شاهد ۱)، به همراه استون (شاهد ۲) و غلظت‌های مختلف (۵۰،

هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای (PAHs) از عناصر کربن و هیدروژن ساخته شده‌اند و شامل دو یا بیشتر حلقه بنزنی متصل به هم می‌باشند (گانگ و همکاران، ۲۰۰۷). PAHs شامل گروه بزرگ و ناهمگنی از آلاینده‌های آلی می‌باشند که عمدتاً از سوختن ناقص مواد آلی منشاء می‌گیرند و به محیط آزاد می‌گردند (لاندستد، ۲۰۰۳). سمیت و اثرات جهش‌زای این مواد و همچنین تمایل آنها برای انباشته شدن در عالم زنده نگرانی‌هایی را در مورد انتقال و سرنوشت آنها در محیط زیست ایجاد کرده است (گانگ و همکاران، ۲۰۱۰). آژانس حفاظت از محیط زیست آمریکا (US-EPA)، ۱۶ ترکیب از PAHs را در لیست توجه خود قرار داده (گائو و زو، ۲۰۰۴) و انجمن بین‌المللی سرطان (ARC)، ۱۵ عدد از این ترکیبات را سرطانزا اعلام کرده‌اند (چائوهان و همکاران، ۲۰۰۸). PAHs به دو گروه ترکیبات با وزن مولکولی پایین (LMV) مشتمل بر دو یا سه حلقه و ترکیبات با وزن مولکولی بالا (HMV) با چهار الی هفت حلقه بنزنی تقسیم می‌شوند (ویلسون و جانز، ۱۹۹۳). فناترن جزء گروه اول با سه حلقه بنزنی و پیرن جزء گروه دوم با چهار حلقه بنزنی متصل به هم می‌باشند (لاندستد، ۲۰۰۳). طبق گزارشات در محیط زیست حدود ۹۰ درصد از PAHs در خاک‌های سطحی قرار دارند (ویلد و جانز، ۱۹۹۵)، بنابراین گیاهان می‌توانند این مواد را جذب کنند و این مسئله مشکلاتی را در تولید محصول هم از نظر کیفیت و هم از نظر کمیت ایجاد خواهد کرد (تومر و جاجو، ۲۰۱۳).

سمیت PAHs برای موجودات زنده و بخصوص گیاهان بسته به نوع ترکیب، غلظت، مدت زمان تأثیر، شرایط محیطی و نوع گونه گیاهی متغیر است (تومر و جاجو، ۲۰۱۴). این ترکیبات می‌توانند از برگها و ریشه‌ها جذب گیاه شوند (کوهن و همکاران، ۲۰۰۴) و اثرات نامطلوبی را از جمله کاهش فتوسنتز و تنفس، تغییر در فعالیت آنزیم‌ها، کاهش رنگیزه‌های فتوسنتزی و آسیب غشاها بر جا گذارند (چیانگ و همکاران، ۱۹۹۶؛ برانکوئینو و همکاران، ۱۹۹۷)

هیدروکربنهای آروماتیک چند حلقه‌ای می‌توانند گیاهان را در تمام مراحل رشدی از جوانه‌زنی تا گلدهی و تولیدمثل تحت تأثیر قرار دهند. یکی از مراحل حساس رشد و نمو گیاهی، فرآیند اندام‌زایی در مرحله جوانه‌زنی است که منجر به تشکیل سیستم ریشه می‌شود (بائود گراست و همکاران، ۱۹۹۳). عدم وجود سیستم پاداکساینده قوی در مراحل اولیه رشد، باعث می‌شود که گیاهان در این مرحله به شدت تحت تأثیر مواد سمی از جمله PAHs قرار بگیرند (کومه روا و همکاران، ۲۰۱۲). افزایش آزاد

محاسبه شد و یک واحد فعالیت، مقدار آنزیم لازم برای احیاء ۱ میکرومول پراکسید هیدروژن در یک دقیقه در نظر گرفته شد. فعالیت ویژه آنزیم به صورت واحد بر میلی گرم پروتئین ($U\ mg^{-1}\ protein$) بیان گردید.

فعالیت آنزیم POD با اندازه گیری افزایش جذب نور در طول موج ۴۷۰ نانومتر طی پلیمریزاسیون گایاکول و تشکیل تتراگایاکول انجام گرفت (اپینگر و همکاران، ۱۹۹۷). یک میلی لیتر محلول واکنش حاوی ۳۰۰ میکرو لیتر گایاکول ۴ میلی مولار، ۳۵۰ میکرو لیتر بافر فسفات ۱۰ میلی مولار، ۳۰۰ میکرو لیتر پراکسید هیدروژن ۵۰ میلی مولار و ۵۰ میکرو لیتر عصاره آنزیمی بود. واکنش با افزودن پراکسید هیدروژن به محلول واکنش شروع شد و تغییرات جذب به مدت ۳ دقیقه ثبت گردید. فعالیت آنزیم با استفاده از ضریب خاموشی گایاکول ($2.67\ mm^{-1}\ cm^{-1}$) محاسبه گردید و یک واحد فعالیت، مقدار آنزیم لازم جهت اکسیداسیون ۱ میکرومولار گایاکول به تتراگایاکول در دقیقه در نظر گرفته شد. فعالیت ویژه آنزیم به صورت واحد بر میلی گرم پروتئین ($U\ mg^{-1}\ protein$) بیان گردید.

فعالیت آنزیم SOD بر اساس اندازه گیری میزان ممانعت از احیاء نوری نیترو بلو تترازولیوم (NBT) توسط عصاره آنزیمی صورت گرفت (وینتربورن و همکاران، ۱۹۷۶). محلول واکنش (۳ میلی لیتر) حاوی ۲/۷ میلی لیتر بافر فسفات سدیم ۶۰ میلی مولار ($pH = 7.8$)، ۱۰۰ میکرو لیتر NBT ۰/۰۵ میلی مولار، ۱۰۰ میکرو لیتر EDTA با غلظت ۷/۶ میلی مولار حاوی ۰/۰۲ میلی-مولار از KCN، ۵۰ میکرو لیتر ریبوفلاوین ۲ میکرو مولار و ۵۰ میکرو لیتر عصاره آنزیمی بود. محلول واکنش در شدت نور ۵۰۰۰ لوکس به مدت ۱۲ دقیقه قرار گرفت و سپس جذب آن در طول موج ۵۶۰ نانومتر ثبت گردید. مقدار آنزیم لازم برای ممانعت ۵۰ درصدی از احیاء نوری NBT به عنوان یک واحد فعالیت آنزیم در نظر گرفته شد و فعالیت ویژه آنزیم به صورت واحد بر میلی گرم پروتئین ($U\ mg^{-1}\ protein$) بیان گردید.

فعالیت آنزیم APX طبق روش بومیناتان و بوران (۲۰۰۲) بر اساس کاهش جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر انجام گرفت. ۱ میلی لیتر محلول واکنش حاوی ۳۰۰ میکرو لیتر بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی مولار ($pH = 7$)، ۲۰۰ میکرو لیتر EDTA با غلظت ۰/۲ میلی مولار، ۲۰۰ میکرو لیتر اسید آسکوربیک ۰/۵ میلی مولار، ۲۰۰ میکرو لیتر آلبومین سرم گاوی ۵۰ میلی مولار، ۵۰ میکرو لیتر عصاره آنزیمی و ۵۰ میکرو لیتر پراکسید هیدروژن ۰/۱ میلی مولار بود. واکنش با افزودن پراکسید هیدروژن شروع شد و فعالیت آنزیم با استفاده از ضریب خاموشی پراکسید هیدروژن ($2.6\ mm^{-1}\ cm^{-1}$)

۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومول بر لیتر) از فنانترن و پیرن به آنها اضافه گردید. پتری دیش های حاوی دانه ها به مدت ۷۲ ساعت در تاریکی و دمای $25^{\circ}C$ نگهداری شدند، سپس پتری دیش ها به شرایط گلخانه ای با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، دمای $25^{\circ}C$ و رطوبت نسبی ۷۰-۵۰٪ منتقل گردیدند. بررسی جوانه زنی دانه ها روزانه به مدت ۵ روز انجام می گرفت.

برداشت گیاهچه ها و انجام سنجش ها

آزمایش هفت روز به طول کشید و تعدادی از نمونه ها به منظور انجام سنجش های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی به نیتروژن مایع منتقل شدند. بقیه نمونه ها جهت اندازه گیری پارامترهای رشدی به دو بخش اندام های هوایی و ریشه تقسیم شدند. هر دو بخش بعد از ششو توسط آب مقطر، بوسیله کاغذ خشک کن خشک شدند و طول و وزن تر آنها اندازه گیری شد. سپس به منظور اندازه گیری وزن خشک به مدت ۷۲ ساعت در $70^{\circ}C$ قرار گرفتند.

سنجش رنگیزه های فتوسنتزی

غلظت رنگیزه های فتوسنتزی (کلروفیل a، b و کاروتنوئیدها) با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد (Analytic Jena, Specol 200). به طور خلاصه، ۰/۱ گرم از اندام های هوایی گیاهچه ها در ۳ میلی لیتر استن ۸۰٪ همگن شدند و بعد از صاف کردن جذب آنها در ۴۷۰، ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر اندازه گیری شد و نهایتاً مقدار رنگیزه ها بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر محاسبه گردید (آرنون، ۱۹۴۹).

سنجش پروتئین های محلول کل و فعالیت آنزیم های پاد

اکساینده

گیاهچه ها در محلول بافر فسفات ۵۰ میلی مولار سرد ($4^{\circ}C$) در هاون چینی له شدند. مخلوط به دست آمده در دمای $4^{\circ}C$ در ۱۰۰۰۰g سانتریفوژ گردید و روشناور بلافاصله برای سنجش پروتئین های محلول با روش برادفورد (۱۹۷۶) و آنزیم های POD، SOD، APX مورد استفاده قرار گرفت.

فعالیت آنزیم CAT با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر طبق روش چانس و مهلی (۱۹۵۵) و با اندازه گیری کاهش مقدار جذب نور در طول موج ۲۴۰ نانومتر به مدت ۳ دقیقه اندازه گیری شد. محلول واکنش حاوی ۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی-مولار ($pH=7$)، ۱ میلی لیتر پراکسید هیدروژن ۱۰ میلی مولار و ۰/۵ میلی لیتر عصاره آنزیمی بود. فعالیت آنزیم با استفاده از ضریب خاموشی پراکسید هیدروژن ($0.04\ mm^{-1}\ cm^{-1}$)

میلی‌مولار مخلوط شدند و در دمای 25°C به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفتند. نهایتاً جذب نوری نمونه‌ها در ۳۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و غلظت پراکسید هیدروژن آنها براساس منحنی استاندارد تهیه شده از غلظت‌های مختلف پراکسید هیدروژن (Merck, Schuchardt, Germany) (۱۲۰-۰ میکرومول) محاسبه شده و به صورت میکروگرم بر گرم وزن تر (g^{-1} μFW) بیان گردید.

محاسبات آماری

تجزیه واریانس نتایج با استفاده از نرم افزار MSTAT-C و مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی در سطح احتمال ۵٪ انجام شد. ترسیم نمودارها با استفاده از نرم افزار Microsoft Excel 2013 انجام گرفت.

نتایج و بحث

جوانه زنی

درصد جوانه زنی دانه‌ها تحت تیمار فناترن و پیرن کاهش یافت، اما در تمام سطوح بکار رفته تأثیر فناترن بیشتر از پیرن بود. فناترن باعث کاهش قابل ملاحظه درصد جوانه زنی در روزهای دوم، سوم و چهارم شد، ولی پیرن فقط در روز دوم این کاهش قابل ملاحظه را نشان داد. افزایش غلظت هر دو ترکیب فناترن و پیرن تغییرات منظمی را در درصد جوانه زنی دانه‌ها نشان نداد و در روز پنجم تفاوت معنی‌داری بین تمام تیمارها نبود. همچنین استون تأثیر معنی‌داری بر جوانه‌زنی دانه‌ها در مقایسه با شاهد گروه یک نداشت (شکل ۱).

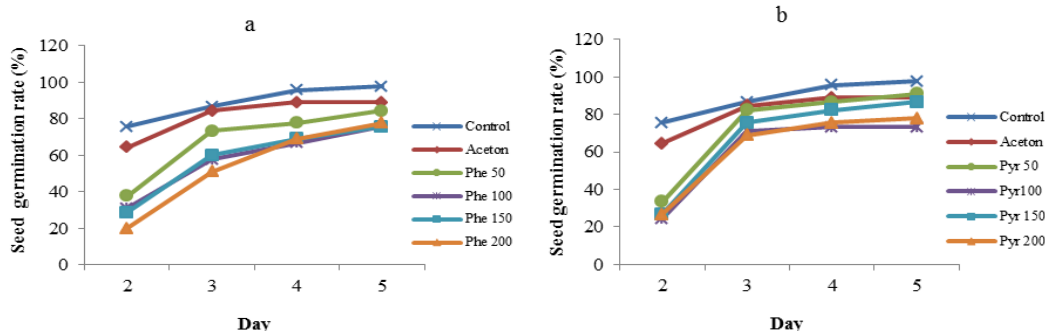
محاسبه گردید. یک واحد فعالیت آنزیم به صورت مقدار آنزیم لازم برای احیاء ۱ میکرولیتر اسید آسکوربیک در دقیقه در نظر گرفته شد و فعالیت ویژه آنزیم به صورت واحد بر میلی‌گرم پروتئین (U mg^{-1} protein) بیان گردید.

سنجش مالون دی‌آلدئید

غلظت مالون دی‌آلدئید (MDA) طبق روش بومیناتان و بوران (۲۰۰۲) اندازه‌گیری شد. گیاهچه کامل در ۲ میلی‌لیتر اسید تری‌کلرواستیک ۰/۱ درصد همگن شده و به مدت ۵ دقیقه در 10000g سانتریفوژ گردید. ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول رویی با ۲ میلی‌لیتر اسید تری‌کلرواستیک ۲۰ درصد حاوی ۰/۵ درصد اسید تیوباریتوریک مخلوط گشت و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم (95°C) حرارت داده شد. محلول حاصل سریعاً به آب یخ منتقل شده و بعد از ۵ دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه در 10000g سانتریفوژ گردید. در نهایت جذب نوری نمونه‌ها در ۵۳۲ نانومتر اندازه‌گیری شد و مقدار MDA با استفاده از منحنی استاندارد تهیه شده با غلظت‌های مختلف از ۳،۱،۱،۳- ترا اتوکسی پروپان (۱۰۰-۱ نانومول) محاسبه و بر حسب میکروگرم بر گرم وزن تر ($\mu\text{g g}^{-1}$ FW) بیان گردید.

سنجش پراکسید هیدروژن

غلظت پراکسید هیدروژن طبق روش هاریناسوت و همکاران (۲۰۰۳) اندازه‌گیری شد. نمونه‌ها در اسید تری‌کلرواستیک ۰/۱ درصد همگن شده و به مدت ۱۵ دقیقه در 12000g سانتریفوژ گردیدند. بلافاصله ۰/۵ میلی‌لیتر از روشناور با ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار ($\text{pH}=7$) و یک میلی‌لیتر یدور پتاسیم ۱



شکل ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف (۲۰۰، ۱۵۰، ۱۰۰، ۵۰) μM از فناترن (a) و پیرن (b) بر جوانه‌زنی دانه‌های گندم.

و $200\mu\text{M}$ از پیرن نسبت به گروه شاهد ۱ و ۲ معنی‌دار بودند ($p < 0/05$). فنانترون و پیرن هر دو وزن خشک گیاهچه‌ها را بطور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد کاهش دادند ولی بین سطوح بکار رفته تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($p < 0/05$). استون تاثیر معنی‌داری در پارامترهای رشدی و تولید بیومس نسبت به شاهد گروه ۱ نداشت ($p < 0/05$) (جدول).

پارامترهای رشد

فنانترون و پیرن باعث کاهش تمام پارامترهای رشد و تولید ماده زنده در گیاهچه‌های گندم شدند. مشابه نتایج حاصل در بخش جوانه‌زنی، تاثیر فنانترون در کاهش پارامترهای رشدی بیشتر از پیرن بود (شکل ۲). وزن تر گیاهچه‌ها با افزایش غلظت هر دو آلاینده کاهش یافت، اما تنها در سطوح $150\mu\text{M}$ و $200\mu\text{M}$ از فنانترون



شکل ۲- تاثیر غلظت‌های مختلف (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، $200\mu\text{M}$) از فنانترون و پیرن بر رشد گیاهچه‌های گندم (عکس در روز پنجم گرفته شده است).

جدول ۱- تاثیر غلظت‌های مختلف از فنانترون و پیرن بر پارامترهای رشد گیاهچه‌های گندم

تیمار	وزن تر گیاهچه (mg)	وزن خشک گیاهچه (mg)	طول اندام‌های هوایی (cm)	طول ریشه (cm)
شاهد	120 ± 10	14 ± 4	$9/13 \pm 0/25$	$30/75 \pm 2/54$
استون	125 ± 10	14 ± 4	$8/5 \pm 0/52$	$27/5 \pm 2/93$
فنانترون	100 ± 20	9 ± 4	$7/25 \pm 0/21$	$23/29 \pm 1/71$
	98 ± 10	8 ± 3	$6/63 \pm 0/25$	$23/08 \pm 0/51$
	91 ± 10	8 ± 3	$5 \pm 0/9$	$21/96 \pm 2/58$
	74 ± 10	7 ± 2	$3/92 \pm 0/52$	$18/58 \pm 2/25$
پیرن	103 ± 10	10 ± 5	$7/71 \pm 0/44$	$24/71 \pm 3/45$
	98 ± 20	10 ± 4	$7/42 \pm 0/76$	$20/42 \pm 2/9$
	92 ± 20	9 ± 3	$6/96 \pm 0/4$	$17/67 \pm 2/26$
	88 ± 10	7 ± 2	$6/76 \pm 0/32$	$18/67 \pm 1/91$

داده‌ها نشان دهنده میانگین سه تکرار از هر تیمار می‌باشد و حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال $p < 0/05$ می‌باشند.

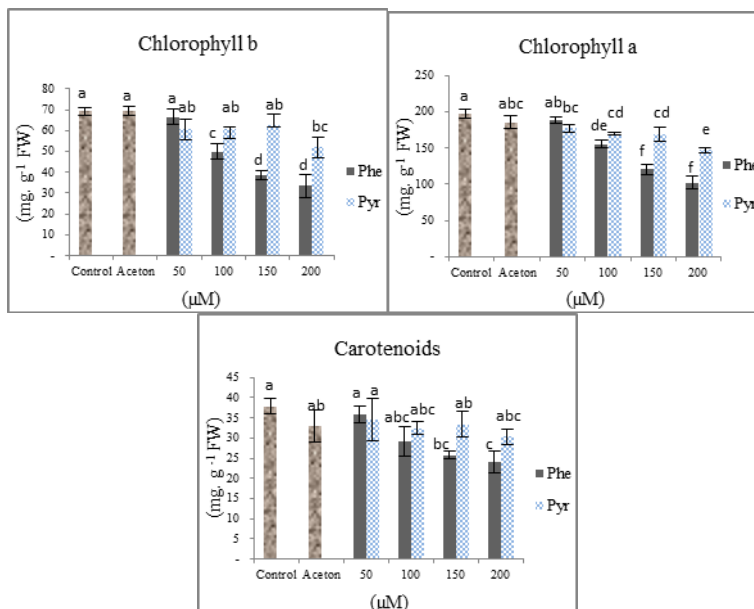
محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی

استون تاثیر معنی‌داری بر محتوای کلروفیل a, b و کاروتنوئیدهای گیاهچه‌ها در مقایسه با گیاهچه‌های شاهد نداشت ($p < 0.05$). اما فنانترونی و پیرن هر دو باعث کاهش محتوای هر سه رنگیزه مورد سنجش گردیدند و این تاثیر با افزایش غلظت تیمارها بیشتر شد و همچنین تاثیر کاهشی فنانترونی در تمام سطوح بکار رفته بیشتر از پیرن بود. تاثیر کاهشی فنانترونی در مورد کلروفیل a و b از سطح $100 \mu\text{M}$ و در مورد کاروتنوئیدها از $150 \mu\text{M}$ به بالا نسبت به گیاهچه‌های شاهد معنی‌دار بود. در صورتی که تاثیر کاهشی پیرن در مورد کاروتنوئیدها نسبت به گیاهچه‌های شاهد در هیچ کدام از سطوح معنی‌دار نبود و در مورد کلروفیل b نیز تنها در سطح $200 \mu\text{M}$ معنی‌دار بود. در ارتباط با کلروفیل a, پیرن در

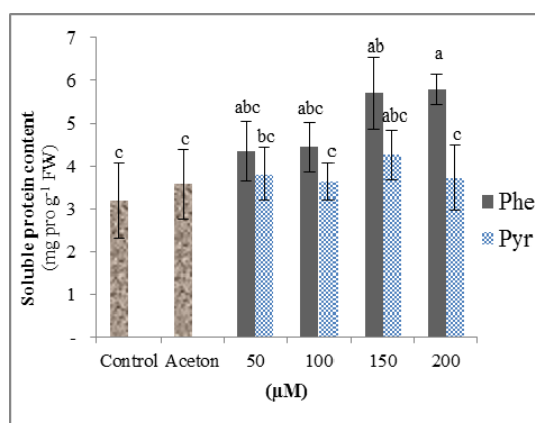
تمام سطوح باعث کاهش معنی‌دار این رنگیزه نسبت به گیاهچه‌های شاهد گردید، اما تاثیر آن بخصوص در سطوح 150 و $200 \mu\text{M}$ بطور معنی‌داری کمتر از فنانترونی بود ($p < 0.05$) (شکل ۳).

محتوای پروتئین محلول کل

افزایش غلظت فنانترونی باعث افزایش محتوای پروتئین محلول کل گردید، هر چند این افزایش در سطوح 150 و $200 \mu\text{M}$ از فنانترونی نسبت به گیاهچه‌های شاهد و تحت تیمار استون معنی‌دار بود ($p < 0.05$). استون و تمام سطوح بکار رفته از پیرن تاثیر معنی‌داری بر محتوای پروتئین محلول کل گیاهچه‌ها نداشتند ($p < 0.05$) (شکل ۴).



شکل ۳- تاثیر غلظت‌های مختلف (۲۰۰، ۱۵۰، ۱۰۰، ۵۰، $200 \mu\text{M}$) از فنانترونی و پیرن بر محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاهچه‌های گندم. داده‌ها مربوط به میانگین سه تکرار از هر تیمار می‌باشند و حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در $p < 0.05$ می‌باشند.

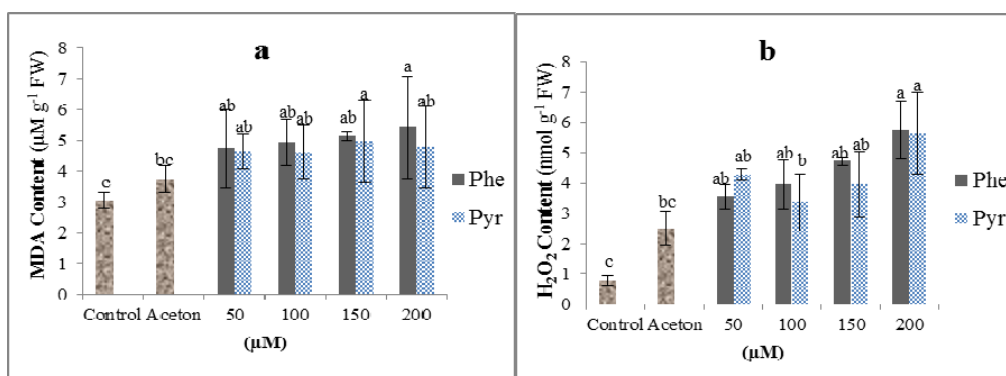


شکل ۴- تاثیر غلظت‌های مختلف (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ μM) از فنانترون و پیرن بر محتوای پروتئین محلول کل گیاهچه‌های گندم. داده‌ها مربوط به میانگین سه تکرار از هر تیمار می‌باشند و حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در $p < 0.05$ می‌باشند.

گیاهان شاهد گردیدند، ولی بین سطوح مختلف بکار رفته از هر دو نوع تیمار تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($p < 0.05$). میزان افزایش MDA گیاهان تیمار یافته با فنانترون در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ μM نسبت به گیاهان شاهد به ترتیب ۱/۵۵، ۱/۶۲، ۱/۶۹ و ۱/۷۸ برابر بود. تغییرات محتوای MDA در گیاهان تیمار یافته با سطوح مختلف پیرن روند منظمی را نشان نداد و بیشترین مقدار مربوط به غلظت ۱۵۰ μM بود (شکل ۵a).

محتوای مالون دی آلدنید (MDA) و پراکسید هیدروژن

فنانترون، پیرن و استون هر سه باعث افزایش محتوای MDA در گیاهچه‌های گندم گردیدند. محتوای MDA گیاهچه‌های تیمار شده با استون ۱/۲۳ برابر بیشتر از گیاهچه‌های شاهد بود، هر چند این تفاوت معنی‌دار نبود ($p < 0.05$). محتوای MDA گیاهان تیمار شده با استون کمتر از مقدار مربوطه در گیاهان تیمار شده با تمام سطوح بکار رفته از فنانترون و پیرن بود. تمام سطوح بکار رفته از فنانترون و پیرن باعث افزایش معنی‌دار MDA در مقایسه با



شکل ۵- تاثیر غلظت‌های مختلف (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ μM) از فنانترون و پیرن بر محتوای مالون دی آلدنید (a) و پراکسید هیدروژن (b) گیاهچه‌های گندم. داده‌ها مربوط به میانگین سه تکرار از هر تیمار می‌باشند و حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در $p < 0.05$ می‌باشند.

هیدروژن سطوح ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ μM از فنانترون نسبت به گیاهچه‌های شاهد به ترتیب ۴/۵۰، ۵/۰۲، ۵/۹۹ و ۷/۳۰ برابر و برای پیرن به ترتیب ۵/۴۳، ۴/۲۷، ۵/۰۳ و ۷/۱۵ برابر بود (شکل ۵b).

فعالیت آنزیم‌های پاداکساینده

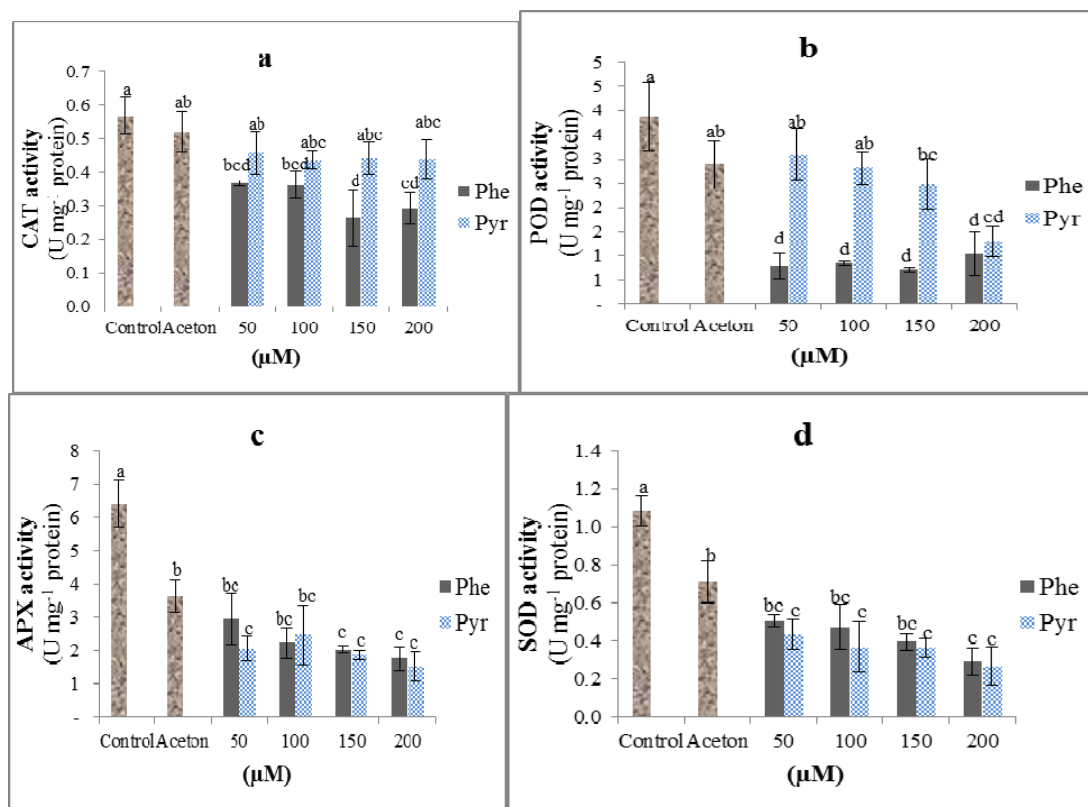
نتایج مشابه با MDA برای محتوای پراکسید هیدروژن گیاهچه‌ها نیز مشاهده شد. استون باعث افزایش ۳/۱۸ برابری محتوای پراکسید هیدروژن گیاهچه‌ها نسبت به گیاهچه‌های شاهد گردید، هر چند این مقدار با سطوح تیماری ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ μM از فنانترون و پیرن معنی‌دار نبود ($p < 0.05$). تمام سطوح تیماری فنانترون و پیرن باعث افزایش معنی‌دار محتوای پراکسید هیدروژن نسبت به گیاهان شاهد گردیدند. افزایش محتوای پراکسید

غلظت‌های ۱۵۰ و ۲۰۰ μM از پیرن به ترتیب ۳۵/۷ و ۶۶/۳ درصد، در مقایسه با گیاهچه‌های شاهد بود. استون تاثیر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم POD در مقایسه با نمونه‌های شاهد نداشت (شکل ۶b).

استون و تمام سطوح بکار رفته از فنانترون و پیرن فعالیت آنزیم‌های APX و SOD را بصورت معنی‌داری در مقایسه با گیاهچه‌های شاهد کاهش دادند، هر چند بین سطوح بکار رفته از فنانترون و پیرن تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($p < 0.05$). هر دو این آنزیم‌ها الگوی کاهشی مشابهی را در برابر افزایش غلظت‌های فنانترون و پیرن نشان دادند. استون فعالیت آنزیم‌های APX و SOD را بطور معنی‌داری به ترتیب ۴۳/۵ و ۳۴/۲ درصد در مقایسه با گروه شاهد کاهش داد ($p < 0.05$) (شکل ۶c,d).

استون همانند فنانترون و پیرن باعث کاهش فعالیت آنزیم CAT در گیاهچه‌های گندم گردید، اما این اثر کاهشی تنها در سطوح غلظتی بکار رفته از فنانترون در مقایسه با گروه شاهد معنی‌دار بود ($p < 0.05$). فنانترون در سطوح غلظتی ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ μM به ترتیب باعث کاهش ۳۵/۴، ۳۶/۳، ۵۳/۶ و ۴۸/۳ درصدی فعالیت آنزیم CAT در مقایسه با گروه شاهد گردید (شکل ۶a).

تمام سطوح غلظتی فنانترون و غلظت‌های ۱۵۰ و ۲۰۰ μM از پیرن باعث کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم POD در گیاهچه‌ها نسبت به گروه شاهد گردیدند ($p < 0.05$). این کاهش در گیاهچه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ μM از فنانترون به ترتیب برابر با ۷۷/۹، ۸۱/۶، ۷۳/۰ و ۷۷/۹ درصد و در



شکل ۶- تاثیر غلظت‌های مختلف (۲۰۰ μM، ۱۵۰، ۱۰۰، ۵۰) از فنانترون و پیرن بر فعالیت آنزیم‌های پاد اکساینده گیاهچه‌های گندم. داده‌ها مربوط به میانگین سه تکرار از هر تیمار می‌باشند و حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در $p < 0.05$ می‌باشند.

۲۰۰۲)، نخود و ذرت (کومه روا و همکاران، ۲۰۱۲) در مطالعات قبلی گزارش شده است. صابونچی و همکاران (۱۳۹۳) نتایج مشابهی را از تاثیر منفی فنانترون بر جوانه‌زنی دانه‌های گندم در خاکهایی با بافتهای متفاوت گزارش کرده‌اند. به هم خوردن تعادل هورمونهای داخلی می‌تواند یکی از عوامل کاهش جوانه‌زنی باشد

فنانترون و پیرن هر دو باعث کاهش درصد جوانه زنی دانه‌ها و تولید بیومس گیاهچه‌های گندم گردیدند، اما تاثیر فنانترون شدیدتر از پیرن بود. تاثیر منفی PAHs بر جوانه‌زنی دانه‌های گندم (صالحی لیسار و دلجو، ۲۰۱۵؛ تومر و جاجو، ۲۰۱۴) و گیاهان دیگر همچون *Lepidium sativum* (مایلا و کلوتس،

محتوای MDA بعنوان یک نشانگر زیستی برای پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی در نتیجه افزایش ROSها در نظر گرفته می‌شود (گونس و همکاران، ۲۰۰۹) و بعنوان یک معیار برای نشان دادن حساسیت گیاهان به تنش‌های زیستی استفاده می‌شود (دبیان و همکاران، ۲۰۰۸). افزایش MDA در گیاهان تیمار یافته با فنانترون در آراییدوپسیس تالیانا (لیو و همکاران، ۲۰۰۹)، گندم، یونجه و آفتابگردان (صالحی لیسار و دلجو، ۲۰۱۵) گزارش شده است. در این مطالعه نیز محتوای MDA گیاهچه‌های تیمار یافته با فنانترون و پیرن افزایش یافت و این روند دارای همبستگی مثبت با تغییرات غلظت فنانترون ($r^2=0/760$) و پیرن ($p=0/572$ و $r^2=0/594$) در محلولهای غذایی گیاهچه‌ها بود. همچنین تغییرات پراکسید هیدروژن در گیاهچه‌های تحت تیمار مشابه تغییرات MDA بود، که این نتایج نشان می‌دهد پیرن و با شدت بیشتر فنانترون باعث ایجاد تنش اکسیداتیو در گیاهچه‌های گندم می‌شوند.

فنانترون در تمام سطوح غلظتی باعث کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های CAT، POD، SOD و APX در گیاهچه‌ها گردید، در مقایسه پیرن باعث کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های SOD و APX در تمام سطوح غلظتی و POD تنها در سطوح غلظتی بالا گردید. نتایج مختلفی در ارتباط با تاثیر PAHs بر آنزیم‌های پاد اکساینده گزارش شده است. در آراییدوپسیس تالیانا گزارش شده که فنانترون باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD، POD و CAT گردیده ولی تاثیر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم CAT نداشته است (لیو و همکاران، ۲۰۰۹). افزایش فعالیت POD در نتیجه تیمار فنانترون در یونجه گزارش شده است (موراتوا و همکاران، ۲۰۰۹). کاهش فعالیت آنزیم CAT در گیاهان یونجه، آفتابگردان و گندم تحت تیمار فنانترون گزارش شده ولی در همین مطالعه مشاهده شده که POD رفتاری متفاوت در اندام‌های هوایی و ریشه هر سه گیاه نشان می‌دهد، بطوریکه در اندام‌های هوایی افزایش و در ریشه کاهش فعالیت را نشان داده است (صالحی لیسار و دلجو، ۲۰۱۵). کاهش فعالیت آنزیم‌های پاد اکساینده در تیمار PAHs احتمالاً نتیجه تنش شدید ناشی از این ترکیبات می‌باشد و این آنزیم‌ها شاید در شروع تنش و در شرایط تنشی معتدل با افزایش فعالیت خود با تنش مقابله می‌کنند ولی به جهت ادامه تنش و افزایش شدت آن دیگر توان فعالیت ندارند و فعالیت‌شان کاهش می‌یابد. این کاهش فعالیت منجر به افزایش بیشتر رادیکالهای آزاد و تنش اکسیداتیو می‌شود، که این امر نیز باعث کاهش فتوسنتز، رشد و تولید بیومس گیاهچه‌ها می‌گردد.

(کومه روا و همکاران، ۲۰۱۲). گزارش شده که نفوذ هیدروکربنها به داخل دانه‌ها و تخریب آنها در داخل دانه‌ها یکی از عوامل تاخیر در جوانه‌زنی است (رینوزو کوئواس و همکاران، ۲۰۰۸). فنانترون و پیرن همچنین رشد و تولید بیومس گیاهچه‌ها را کاهش دادند، بطوریکه با افزایش غلظت ترکیبات تاثیر منفی آنها نیز بیشتر شد. کاهش رشد و تولید بیومس گیاهان در نتیجه تیمار با PAHs در گیاهان گندم (صالحی لیسار و دلجو، ۲۰۱۵؛ تومر و جاجو، ۲۰۱۴)، ذرت و نخود (کومه روا و همکاران، ۲۰۱۲) و آراییدوپسیس تالیانا (لیو و همکاران، ۲۰۰۹) قبلاً گزارش شده است. همچنین در این بررسی مشاهده شد که پیرن و با شدت بیشتر فنانترون باعث کاهش محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی گردیدند. در ارتباط با تاثیر پیرن بر محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاهان گزارشی بدست نیامد، اما نتایج مشابه تاثیر فنانترون بر محتوای رنگیزه‌ها فتوسنتزی در گیاه سورگوم توسط علایی و همکاران (۱۳۸۹) و دیگر گیاهان مختلف در بررسیهای قبلی گزارش شده است (صالحی لیسار و دلجو، ۲۰۱۵؛ تومر و جاجو، ۲۰۱۴؛ لیو و همکاران، ۲۰۰۹). به احتمال زیاد سمیت PAHs باعث تخریب رنگیزه‌های فتوسنتزی و به تبع آن کاهش فتوسنتز و آنها باعث کاهش تولید بیومس می‌شود. نتایج حاصل از این بررسی آشکارا نشان می‌دهد که فنانترون شدیدتر از پیرن باعث کاهش درصد جوانه‌زنی دانه‌ها، رشد گیاهچه‌ها و محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی می‌شود. این تفاوت در عملکرد می‌تواند ناشی از این امر باشد که حلالیت فنانترون در آب (1.18 mg l^{-1} at 25°C) بیشتر از پیرن (0.12 mg l^{-1} at 25°C) می‌باشد و این تفاوت باعث جذب یا نفوذ بیشتر فنانترون نسبت به پیرن به داخل گیاه می‌شود، در نتیجه تاثیر فنانترون شدیدتر از پیرن خواهد بود. همچنین پیرن بخاطر ضریب اکتانل یا چربی دوستی بالا ($K_{ow} = 5.32$) نسبت به فنانترون ($K_{ow} = 4.46$)، تمایل به ماندن در بافت‌های ریشه دارد در صورتیکه فنانترون به سرعت به تمام بخشهای گیاه منتشر می‌شود و اثرات منفی خود را بر متابولیسم گیاه می‌گذارد (کانگ و همکاران، ۲۰۱۰).

محتوای پروتئین کل گیاهچه‌های تیمار یافته با غلظت‌های بالای فنانترون بطور معنی‌داری نسبت به گیاهچه‌های شاهد افزایش پیدا کرد، نتایج مشابه این، در بررسیهای دیگر در ارتباط با گیاهان آفتابگردان، یونجه و گندم گزارش شده است (صالحی لیسار و دلجو، ۲۰۱۵). به نظر می‌رسد محتوای پروتئین بالا یک نوع مکانیسم سازشی برای گیاهان در برابر تنش‌های شیمیایی از جمله PAHs باشد.

- Harinasut, P., Poonsopa, D., Roengmongkol, K. and Charoensataporn, R. 2003. Salinity effects on antioxidant enzymes in mulberry cultivar. *Sci. Asia*, 29.
- Kang, F., Chen, D., Gao, Y. and Zhang, Y. 2010. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in subcellular root tissues of ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.). *BMC Plant Biology*, 10, 210.
- Kuhn, A., Ballach, H.-J. and Wittig, R. 2004. Studies in the biodegradation of 5 PAHs (Phenanthrene, pyrene, fluoranthene, chrysene und benzo (a) pyrene) in the presence of rooted poplar cuttings. *Environ Sci Pollut Res*, 11, 22-32.
- Kummerova, M., Gloser, J., Slovák, L. and Holoubek, I. 1996. Project Tocoen. The fate of selected organic compounds in the environment. The growth response of maize to increasing concentrations of fluoranthene. *Toxicol Environ Chem*, 54, 99-106.
- Kummerova, M., Slovak, L. and Holoubek, I. 1997. Growth response of spring barley to short-or long-period exposures to fluoranthene. *Rost Vyroba (Czech Republic)*.
- Kummerova, M., Zezulka, S., Vanova, L. and Fiserova, H. 2012. Effect of organic pollutant treatment on the growth of pea and maize seedlings. *Open Life Sci*, 7, 159-166.
- Liu, H., Weisman, D., Ye, Y.-B., Cui, B., Huang, Y.-H., Colón-Carmona, A. and Wang, Z.-H. 2009. An oxidative stress response to polycyclic aromatic hydrocarbon exposure is rapid and complex in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci*, 176, 375-382.
- Lundstedt, S. 2003. Analysis of PAHs and their transformations products in contaminated soil and remedial processes. (Doctoral dissertation, Kemi).
- Maila, M. P. and Cloete, T. E. 2002. Germination of *Lepidium sativum* as a method to evaluate polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) removal from contaminated soil. *Int Biodeter Biodegr*, 50, 107-113.
- Muratova, A. Y., Kapitonova, V. V., Chernyshova, M. P. and Turkovskaya, O. V. 2009. Enzymatic activity of alfalfa in a phenanthrene-contaminated environment. *World Acad Sci Eng Technol*, 58, 569-574.
- Obinger, C., Maj, M., Nicholls, P. and Loewen, P. 1999. Activity, Peroxide Compound Formation, and Heme d Synthesis in *Escherichia coli* HPII Catalase. *Arch Biochem Biophys*, 342, 58-67.
- Reynoso-Cuevas, L., Gallegos-Martínez, M., Cruz-Sosa, F. and Gutiérrez-Rojas, M. 2008. In vitro evaluation of germination and growth of five plant species on medium supplemented with hydrocarbons associated with contaminated soils. *Bioresour technol*, 99, 6379-6385.
- Salehi-Lisar, S. Y. and Deljoo, S. 2015a. Physiological effect of phenanthrene on *Triticum aestivum*, *Helianthus annuus* and *Medicago sativa*. *EurAsian J Bio Sci*, 9, 29-37.
- Tomar, R. S. and Jajoo, A. 2013. A quick investigation of the detrimental effects of environmental pollutant polycyclic aromatic hydrocarbon fluoranthene on the photosynthetic efficiency of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Ecotoxicology*, 22, 1313-1318.
- Tomar, R. S. and Jajoo, A. 2014. Fluoranthene, a polycyclic aromatic hydrocarbon, inhibits light as well as dark reactions of photosynthesis in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Ecotox environ safe*, 109, 110-115.
- Wild, S. R. and Jones, K. C. 1995. Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: a preliminary source inventory and budget. *Environ pollut*, 88, 91-108.
- Wilson, S. C. and Jones, K. C. 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Environ pollut*, 81, 229-249.
- Winterbourn, C. C., Mcgrath, B. M. and Carrell, R. W. 1976. Reactions involving superoxide and normal and unstable haemoglobins. *Biochem J*, 155, 493-502.

Comparative study of the phenanthrene and pyrene effects on germination, growth and antioxidant enzymes activity on wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.)

A. Sobhani¹, S.Y. Salehi-Lisar², A. Movafeghi³

Received: 2017-5-15 Accepted: 2017-9-15

Abstract

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are an important group of organic pollutants which have high potency to affect different aspects of plants growth and development. Accordingly, the aim of this study was the evaluation of the germination, growth and physiological responses of wheat seedlings exposed to phenanthrene and pyrene toxicity. Wheat were cultivated hydroponically and treated by 50, 100, 150 and 200 μ M of phenanthrene and pyrene for 7 days. Activity of the superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), catalase (CAT), and ascorbate peroxidase (APX), as well as H_2O_2 , MDA and photosynthetic pigments content, were measured spectrophotometrically. Both compounds decreased germination rate, growth, biomass production and pigments content, however the effect of phenanthrene was higher than that of pyrene. Except of CAT, other antioxidant enzymes activity decreased with increasing in concentration of compounds. H_2O_2 and MDA content increased correlating with phenanthrene and pyrene levels. These results indicated that induction of oxidative stress is one of the main reasons for lower plant growth rate and other harmful outcomes in PAHs contaminated environments.

Keywords: Wheat, polycyclic aromatic hydrocarbones, oxidative stress, physiological effects

1- PhD Student, Department of Plant Science, College of Natural Science, Tabriz University, Tabriz, Iran

2- Associated Professor, Department of Plant Science, College of Natural Science, Tabriz University, Tabriz, Iran

3- Professor, Department of Plant Science, College of Natural Science, Tabriz University, Tabriz, Iran