

بررسی تأثیر فناترن و پیرن بر رنگیزه‌های فتوستتزی، تمامیت غشاء سلولی و فعالیت آنزیمهای پاداکساینده در گیاه گندم (*Triticum aestivum* L.)



ایوب سبحانی، سید یحیی صالحی لیسار* و علی موافقی

ایران، تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکده علوم طبیعی، گروه علوم گیاهی

تاریخ پذیرش: ۹۶/۹/۱۳

تاریخ دریافت: ۹۵/۳/۳۰

چکیده

هیدروکربنهای آروماتیک چند حلقه‌ای (PAHs) از آلاینده‌های آلی می‌باشند که عمدتاً در نتیجه احتراق ناقص ترکیبات آلی آزاد می‌شوند. این آلاینده‌ها در غلظتهای بالا در خاکهای بعضی مناطق جهان یافت می‌شوند و اثرات زیان‌بار بر موجودات زنده مختلف از جمله گیاهان دارند. در این آزمایش گیاهان گندم در محیط هیدروپونیک تحت تیمار غلظتهای مختلف پیرن و فناترن کشت داده شدند و پس از تعیین غلظتهای مؤثر این ترکیبات، تأثیر آنها بر برخی شاخصهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفت. فناترن باعث کاهش معنی‌دار رنگیزه‌های فتوستتزی و تمامیت غشای سلولی، افزایش مالون دی‌آلدئید، افزایش پراکسید هیدروژن در ریشه و کاهش پراکسید هیدروژن در اندامهای هوایی گردید، در حالی که پیرن تأثیر معنی‌داری بر این شاخصها نداشت. در اندامهای هوایی فناترن باعث کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیمهای کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و پراکسیداز (POX) گردید، در حالی که پیرن تنها باعث کاهش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز شد. در ریشه هر دو آلاینده باعث کاهش فعالیت آنزیمهای APX، SOD و POX و افزایش فعالیت CAT گردیدند که البته تأثیر فناترن بیشتر از پیرن بود. طبق این بررسی این دو ترکیب به‌خصوص فناترن از طریق اختلال در عملکرد ریشه و کاهش فعالیت آنزیمهای پاداکساینده باعث ایجاد تنش اکساینده و در نتیجه کاهش رنگیزه‌های فتوستتزی، تمامیت غشاء و نهایتاً کاهش رشد گیاه می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: آنزیمهای پاداکساینده، پیرن، فناترن، گندم

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۴۹۰۰۳۲۷۲، پست الکترونیکی: y_salehi@tabrizu.ac.ir

مقدمه

بر مقدار آنها در محیط افزوده می‌شود، به همین دلیل از توجه ویژه‌ای به عنوان آلاینده در بین محققان برخوردار می‌باشند (۵ و ۱۶).

مطالعات قبلی نشان داده‌اند که هیدروکربنهای آروماتیک چند حلقه‌ای می‌توانند از طریق فرآیندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی، رشد گیاهان را هم از نظر کیفی و هم از نظر کمی تحت تأثیر قرار دهند. این مواد باعث کاهش فتوستتزی و تنفس در گیاهان شده و همچنین باعث تغییرات

هیدروکربنهای آروماتیک چند حلقه‌ای (PAHs) گروهی از آلاینده‌های آلی پایدار در طبیعت می‌باشند که عمدتاً حاصل احتراق ناقص سوخته‌های فسیلی می‌باشند (۱۶). امروزه به دلیل صنعتی شدن جوامع و افزایش فعالیت صنایع، آزادسازی این مواد به طبیعت بیش از ظرفیت محیط زیست گشته، بنابراین می‌توانند یکی از عوامل به هم خوردن تعادل محیط زیست باشند. از آنجایی که اکثر این ترکیبات برای موجودات زنده، سمی و جهش‌زا بوده و همچنین از پایداری بالا در طبیعت برخوردار می‌باشند و روز به روز

کننده آنها در گیاهان از نظر گیاه پالایی نیز لازم به نظر می‌آید (۱۸).

این پژوهش با هدف بررسی اثرات دو ترکیب فناترن و پیرن که از جمله هیدروکربنهای آروماتیک چند حلقه‌ای فراوان در طبیعت می‌باشند، بر مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی، تمامیت غشاء و فعالیت آنزیمهای پاداکساینده گیاه گندم در شرایط آبکشت در بستر پرلیت انجام شد.

مواد و روشها

تیمار دهی: ابتدا ظرفیت مزرع‌های پرلیت مورد استفاده اندازه‌گیری شد، سپس به منظور تهیه غلظتهای مورد نظر از فناترن و پیرن (۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و 500 mg kg^{-1})، مقادیر لازم از هر یک در اتانول حل گردید. محلولهای به-دست آمده به پرلیت اسپری شدند و پس از مخلوط کردن به مدت ۴۸ ساعت در هوای آزاد قرار گرفت تا اتانول موجود در آن تبخیر شود. عمل تیمار کردن تنها یک مرتبه و در شروع آزمایش انجام شد.

کشت گیاهان: گیاه مورد استفاده در این پژوهش گندم (*Triticum aestivum* L.) رقم پیشگام بود. بذره‌های گندم از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان شرقی (تبریز) تهیه گردیده و تا زمان کشت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بذرها به وسیله هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه ضد عفونی شده و در گلدانهای حاوی پرلیت تیمار نشده به عنوان شاهد و تیمار شده با غلظتهای مختلف از فناترن و پیرن کشت داده شدند. سپس گلدانها به اندازه ظرفیت مزرع‌های توسط آب مقطر آبیاری گردیده و به مدت سه روز در تاریکی قرار گرفتند. بعد از جوانه‌زنی بذرها، گیاهان در شرایط فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، دمای ۳۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۶۰-۵۰ درصد و شدت نور ۶۰۰۰ لوکس قرار گرفتند. گلدانها به مدت ۸ روز توسط آب مقطر، ۸ روز محلول غذایی هوگلند ۵۰ درصد و به

هورمونی، تغییر در فعالیت آنزیمها و محتوای رنگیزه‌ها می‌شوند (۲۴).

تجمع مواد سمی از جمله PAHs در گیاه سبب ایجاد تنش اکسایشی می‌شود. این مواد در غلظتهای زیاد، بر رشد و عملکرد گیاهان اثرات منفی بر جای می‌گذارند و سبب آزاد شدن گونه‌های فعال اکسیژن نظیر رادیکال هیدروکسیل، سوپراکسید و پراکسید هیدروژن در گیاه شده، بر ساختار غشاء سلولی تأثیر گذاشته و با ایجاد آسیبهای غشایی سبب اختلال در فرآیندهای مختلف سلولی می‌گردند (۸). در یک مطالعه روی آرابیدوپسیس نشان داده شده است که فناترن باعث افزایش سطح رادیکالهای فعال اکسیژن می‌گردد. از آنجایی که افزایش این رادیکالها باعث راه اندازی مرگ برنامه ریزی شده در سلول می‌شود، بنابراین گیاه مجبور است مقدار رادیکالهای فعال را توسط فرآیندهای مختلف آنزیمی تنظیم کند (۶). آنزیمهایی پاداکساینده از جمله کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POX)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و آسکوربات پراکسیداز (APX) می‌توانند در این امر نقش مهمی داشته باشند. در این فرآیند SOD باعث احیای سوپراکسید به پراکسید هیدروژن می‌شود که سپس توسط CAT و POX به آب احیاء می‌شود. آنزیم APX از طریق اکسیداسیون آسکوربات و تولید منو دی هیدروآسکوربات به این کار کمک می‌کند (۱۸). مطالعات نشان داده است که تنشهای غیر زیستی باعث فراتنظیمی این فرآیندها می‌شوند (۱۳). در یک پژوهش، صابونچی و همکاران (۱۳۹۳) نشان داده‌اند که فناترن تأثیری بازدارنده و معنی‌دار بر جوانه‌زنی و رشد گیاه گندم دارد (۲). علی‌رغم اثرات منفی شناخته شده هیدروکربنهای آروماتیک چند حلقه‌ای در گیاهان، برخی گونه‌های گیاهی می‌توانند این مواد را جذب کرده و در خود انباشته سازند و یا حتی آنها را به ترکیبات غیر سمی تبدیل کنند. برای همین شناخت سازوکارهای جذب، پاسخهای مولکولی گیاهان به این مواد و آنزیمهای خنثی

سنجش پروتئینهای محلول کل و فعالیت آنزیمهای پاداکساینده: تقریباً ۱ گرم از نمونه گیاهی در محلول بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار سرد ($\text{pH} = 7$) در هاون چینی له شدند. مخلوط به دست آمده در دمای ۴ درجه در ۱۰۰۰۰g سانتریفیوژ گردید و روشناور بلافاصله برای سنجش پروتئینهای محلول با روش برادفورد (۱۹۷۶) و فعالیت آنزیمهای CAT، POD، SOD و APX مورد استفاده قرار گرفت.

فعالیت آنزیم CAT با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر طبق روش Meahly و Chance (۱۹۵۵) و با اندازه‌گیری کاهش مقدار جذب نور در طول موج ۲۴۰ نانومتر به مدت ۳ دقیقه اندازه‌گیری شد (۱۱). محلول واکنش حاوی ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار ($\text{pH}=7$)، ۱ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن ۱۰ میلی‌مولار و ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی بود. فعالیت آنزیم با استفاده از ضریب خاموشی پراکسید هیدروژن ($0.04 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) محاسبه شد و یک واحد فعالیت، مقدار آنزیم لازم برای احیای ۱ میکرومول پراکسید هیدروژن در یک دقیقه در نظر گرفته شد. فعالیت ویژه آنزیم به صورت واحد بر میلی‌گرم پروتئین ($\text{U mg}^{-1} \text{ protein}$) بیان گردید.

فعالیت آنزیم POD با اندازه‌گیری افزایش جذب نور در طول موج ۴۷۰ نانومتر طی پلیمریزاسیون گایاکول و تشکیل تترآگایاکول انجام گرفت (۲۰). یک میلی‌لیتر محلول واکنش حاوی ۳۰۰ میکرولیتر گایاکول ۴ میلی-مولار، ۳۵۰ میکرولیتر بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار، ۳۰۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۵۰ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. واکنش با افزودن پراکسید هیدروژن به محلول شروع شد و تغییرات جذب به مدت ۳ دقیقه ثبت گردید. فعالیت آنزیم با استفاده از ضریب خاموشی گایاکول ($26/6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) محاسبه گردید و یک واحد فعالیت، مقدار آنزیم لازم جهت اکسیداسیون ۱ میکرومولار گایاکول به تترآگایاکول در دقیقه در نظر گرفته

مدت ۱۴ روز توسط محلول غذایی هوگلند ۱۰۰ درصد هر دو روز یکبار در حد ظرفیت مزرعه‌ای آبیاری شدند. گیاهان از ابتدای جوانه‌زنی تا برداشت تحت تیمار دو آلاینده قرار داشتند و بعد از ۳۰ روز به منظور انجام سنجشهای مورد نظر برداشت شدند. برای تعیین غلظتهای مؤثر و اندازه‌گیری پارامترهای رشد، گیاهان در پنج سطح (۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و 500 mg kg^{-1}) و برای سنجشهای بیوشیمایی در دو سطح (۲۰۰ و 400 mg kg^{-1}) از فنانترن و پیرن کشت داده شدند.

سنجش رنگی‌های فتوستتزی: غلظت رنگی‌های فتوستتزی (کلروفیل a، b و کاروتنوئیدها) با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد (Analytic Jena, Specol 200). به‌طور خلاصه، ۰/۱ گرم از برگ گیاه در ۳ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد همگن شدند و بعد از صاف کردن جذب آنها در ۴۷۰، ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر اندازه‌گیری شد و نهایتاً مقدار رنگی‌ها بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه گردید (۷).

سنجش تمامیت غشای سلولی: ۰/۱ گرم از برگ گیاه به قطعاتی مساوی تقسیم گردید و داخل بشر ۵۰ میلی‌لیتر منتقل گردید و ۱۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر روی آنها اضافه شد. برای هر گلدان دو بار نمونه برداری انجام گرفت. یک سری از نمونه‌ها داخل آون در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و سری دیگر داخل بن ماری جوشان با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفتند. سپس به وسیله EC متر (HANNA9812) هدایت الکتریکی محلولها سنجش شد و طبق فرمول زیر شاخص تمامیت غشاء محاسبه گردید که در آن MSI نشانگر شاخص تمامیت غشاء و C_1 و C_2 به ترتیب نشانگر هدایت الکتریکی عصاره برگگی در دمای ۴۰ و ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشند (۲۱).

$$MSI = \left[1 - \left(\frac{C_2}{C_1} \right) \right] \times 100$$

سنجش مالون دی‌آلدئید: غلظت مالون دی‌آلدئید (MDA) طبق روش Boominathan و Doran (۲۰۰۲) اندازه‌گیری شد (۹). ۰/۱ گرم از نمونه‌ها در ۲ میلی‌لیتر اسید تری‌کلرواستیک ۰/۱ درصد در صد همگن شده و به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفیوژ گردید. ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول رویی با ۲ میلی‌لیتر اسید تری‌کلرواستیک ۲۰ درصد حاوی ۰/۵ درصد اسید تیوباربتوریک مخلوط گشت و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم (۹۵ درجه سانتی‌گراد) حرارت داده شد. محلول حاصل سریعاً به آب یخ منتقل شده و بعد از ۵ دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفیوژ 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 توکسی پروپان (۱۰۰-۱نانومول) محاسبه و بر حسب میکروگرم بر گرم وزن تر ($\mu\text{g g}^{-1}\text{ FW}$) بیان گردید.

سنجش پراکسید هیدروژن: غلظت پراکسید هیدروژن طبق روش Harinasut و همکاران (۲۰۰۳) اندازه‌گیری شد (۱۵). نمونه‌ها در اسید تری‌کلرواستیک ۰/۱ درصد همگن شده و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ گردیدند. بلافاصله ۰/۵ میلی‌لیتر از روش‌ناور با ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار (pH=۷) و یک میلی‌لیتر یدور پتاسیم ۱ میلی‌مولار مخلوط شدند و در دمای ۲۵ درجه 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 ($\mu\text{g g}^{-1}\text{ FW}$) بیان گردید.

محاسبات آماری: آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار برای هر تیمار انجام شد. تجزیه واریانس نتایج با استفاده از نرم افزار MSTAT-C و مقایسه میانگینها با آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. ترسیم نمودارها

شد. فعالیت ویژه آنزیم به صورت واحد بر میلی‌گرم پروتئین ($\text{U mg}^{-1}\text{ protein}$) بیان گردید.

فعالیت آنزیم SOD براساس اندازه‌گیری میزان ممانعت از احیای نوری نیترو بلو تترازولیوم (NBT) توسط عصاره آنزیمی صورت گرفت (۲۵). محلول واکنش (۳ میلی‌لیتر) حاوی ۲/۷ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ۶۰ میلی‌مولار (pH=۷/۸)، ۱۰۰ میکرولیتر NBT ۰/۰۵ میلی‌مولار، ۱۰۰ میکرولیتر EDTA با غلظت ۷/۶ میلی‌مولار حاوی ۰/۰۲ میلی‌مولار از KCN (به عنوان بازدارنده فعالیت آنزیم)، ۵۰ میکرولیتر ریپوفلاوین ۲ میکرومولار و ۵۰ میکرولیتر 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 احیای نوری NBT به عنوان یک واحد فعالیت آنزیم در نظر گرفته شد و فعالیت ویژه آنزیم به صورت واحد بر میلی‌گرم پروتئین ($\text{U mg}^{-1}\text{ protein}$) بیان گردید.

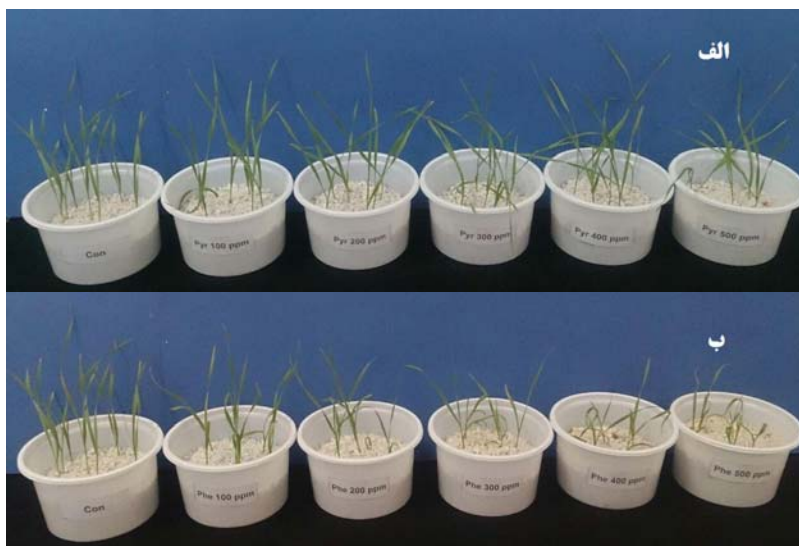
فعالیت آنزیم SOD طبق روش Boominathan و Doran (۲۰۰۲) بر اساس کاهش جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر انجام گرفت (۹). ۱ میلی‌لیتر محلول واکنش حاوی ۳۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷)، ۲۰۰ میکرولیتر EDTA با غلظت ۰/۲ میلی‌مولار، ۲۰۰ میکرولیتر اسید آسکوربیک ۰/۵ میلی‌مولار، ۲۰۰ میکرولیتر آلبومین سرم گاوی ۵۰ میلی‌مولار، ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی و ۵۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۰/۱ میلی‌مولار بود. واکنش با افزودن پراکسید هیدروژن شروع شد و فعالیت آنزیم با استفاده از ضریب خاموشی اسید آسکوربیک ($2/6\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) محاسبه گردید. یک واحد فعالیت آنزیم به صورت مقدار آنزیم لازم برای احیای ۱ میکرولیتر اسید آسکوربیک در دقیقه در نظر گرفته شد و فعالیت ویژه آنزیم به صورت واحد بر میلی‌گرم پروتئین ($\text{U mg}^{-1}\text{ protein}$) بیان گردید.

بود. کاهش رشد گیاهان در تیمارهای فنانترن بیشتر از تیمارهای پیرن بود. غلظتهای بالاتر از 100 mg kg^{-1} از فنانترن و بالاتر از 300 mg kg^{-1} از پیرن باعث کاهش معنی دار وزن تر، خشک و طول اندامهای هوایی گردیدند. اختلاف معنی داری بین غلظتهای مختلف پیرن مشاهده نشد، ولی افزایش غلظت فنانترن باعث کاهش معنی دار این شاخصها گردید ($p \leq 0.05$) (جدول ۱).

با استفاده از نرم افزار Microsoft Excel 2007 انجام گرفت.

نتایج

تأثیر غلظتهای مختلف فنانترن و پیرن بر شاخصهای رشد: تیمار پیرن و فنانترن باعث کاهش رشد گیاه گندم شد (شکل ۱)، به طوری که این کاهش در وزن تر و خشک و همچنین طول اندامهای هوایی و ریشه گیاهان قابل مشاهده



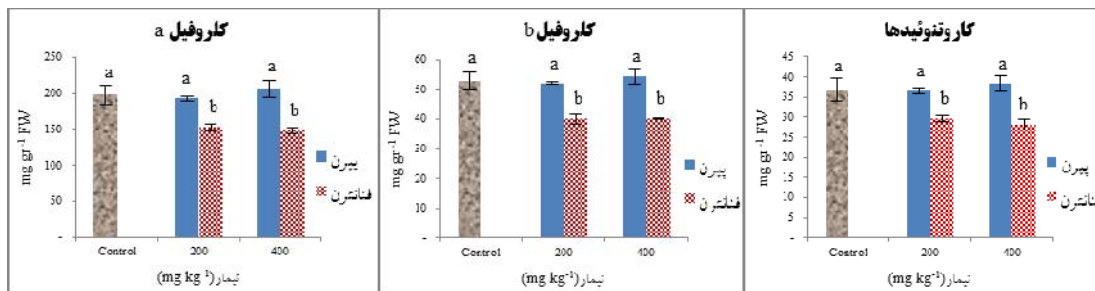
شکل ۱- تأثیر غلظتهای مختلف (پیرن (mg kg⁻¹) الف) و فنانترن (ب) بر رشد گیاهان ۳۰ روزه گندم (Pyr: پیرن، Phe: فنانترن).

جدول ۱- تأثیر غلظتهای مختلف (۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و 500 mg kg^{-1}) فنانترن و پیرن بر شاخصهای رشد گیاه گندم سی روزه. اعداد مربوط به هر شاخص که دارای حروف مشترک می باشند از نظر آماری تفاوت معنی داری با هم ندارند ($P \leq 0.05$ و $n=3$).

غلظت	اندامهای هوایی			ریشه		
	وزن تر (mg)	وزن خشک (mg)	طول (cm)	وزن تر (mg)	وزن خشک (mg)	طول (cm)
شاهد	$151/11 \pm 16/77^a$	$23/11 \pm 2/83^a$	$36/00 \pm 3/21^a$	$48/89 \pm 3/84^a$	$9/89 \pm 1/58^a$	$45/33 \pm 4/80^a$
۱۰۰	$132/22 \pm 13/47^{ab}$	$19/55 \pm 2/45^{ab}$	$32/10 \pm 1/34^{ab}$	$52/22 \pm 3/84^a$	$8/55 \pm 0/69^{ab}$	$36/21 \pm 5/50^b$
۲۰۰	$124/44 \pm 8/38^{ab}$	$18/00 \pm 1/20^{ab}$	$30/88 \pm 2/14^{ab}$	$48/88 \pm 5/09^a$	$7/66 \pm 0/33^b$	$38/66 \pm 1/85^{ab}$
۳۰۰	$118/89 \pm 9/93^b$	$16/22 \pm 1/26^{bc}$	$30/33 \pm 1/45^b$	$47/77 \pm 7/69^a$	$7/44 \pm 0/19^b$	$35/77 \pm 2/14^b$
۴۰۰	$121/11 \pm 10/71^b$	$17/00 \pm 2/96^b$	$30/21 \pm 2/14^b$	$52/22 \pm 5/09^a$	$7/89 \pm 0/69^{ab}$	$37/77 \pm 4/43^{ab}$
۵۰۰	$120/00 \pm 6/66^b$	$16/22 \pm 1/64^{bc}$	$30/44 \pm 1/50^{ab}$	$51/11 \pm 6/93^a$	$6/89 \pm 0/19^{bc}$	$36/99 \pm 1/15^{ab}$
۱۰۰	$120/00 \pm 10/00^b$	$17/44 \pm 2/16^b$	$30/10 \pm 2/60^b$	$41/11 \pm 1/92^{ab}$	$6/78 \pm 0/84^{bc}$	$35/22 \pm 2/71^b$
۲۰۰	$82/22 \pm 5/09^c$	$11/44 \pm 0/38^{cd}$	$23/22 \pm 1/83^c$	$33/33 \pm 3/33^{bc}$	$5/00 \pm 0/33^{cd}$	$24/88 \pm 1/38^c$
۳۰۰	$78/88 \pm 5/09^c$	$10/88 \pm 0/50^d$	$19/66 \pm 1/15^{cd}$	$26/66 \pm 5/77^c$	$3/88 \pm 0/77^d$	$23/22 \pm 1/17^c$
۴۰۰	$71/11 \pm 1/92^c$	$9/33 \pm 0/33^d$	$19/33 \pm 1/45^{cd}$	$25/55 \pm 1/92^c$	$3/66 \pm 0/58^d$	$22/33 \pm 0/57^c$
۵۰۰	$67/77 \pm 5/09^c$	$9/22 \pm 0/19^d$	$16/66 \pm 1/00^d$	$24/44 \pm 1/92^c$	$3/44 \pm 0/51^d$	$17/99 \pm 1/20^c$

(شکل ۲)، ولی فناترن به ترتیب باعث کاهش ۲۳/۱۶، ۲۴/۳۶ و ۱۹/۹۸ درصدی در محتوای کلروفیل a، b و کاروتنوئیدها در غلظت ۲۰۰، و همچنین کاهش ۲۵/۲۲، ۲۴/۲۵ و ۲۳/۲۱ درصدی در غلظت ۴۰۰ mg kg⁻¹ شد.

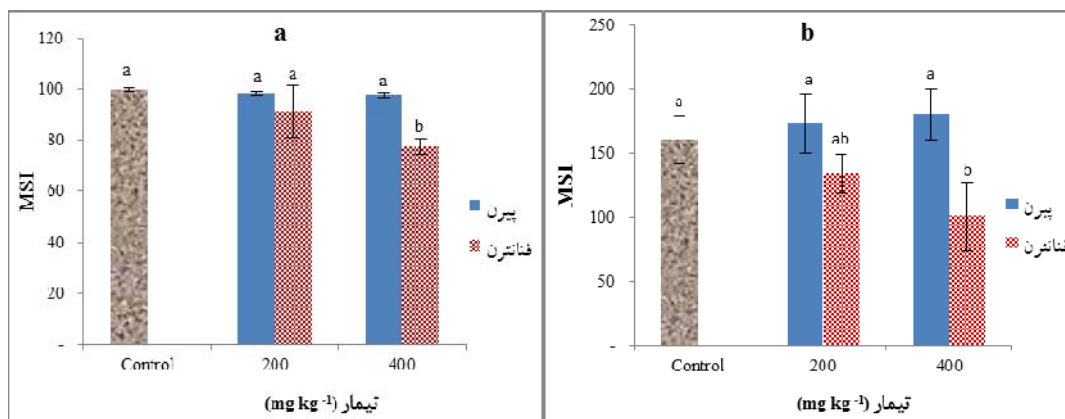
رنگی‌های فتوسنتزی: پیرن تأثیر معنی‌داری بر محتوای رنگی‌های فتوسنتزی نداشت، ولی فناترن باعث کاهش معنی‌دار محتوای کلروفیل a، b و کاروتنوئیدها در مقایسه با گیاهان شاهد گردید ($p \leq 0/05$). هر چند اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف فناترن وجود نداشت



شکل ۲- تأثیر فناترن و پیرن بر محتوای کلروفیل a، b و کاروتنوئیدها در اندام‌های هوایی گیاه گندم. حروف یکسان نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد (n=۳).

اندام‌های هوایی بود. فناترن در غلظت ۴۰۰ mg kg⁻¹ باعث کاهش معنی‌دار شاخص تمامیت غشاء هم در اندام‌های هوایی (۲۲/۰۸ درصد) و هم در ریشه (۳۷/۳۱ درصد) گردید (شکل ۳).

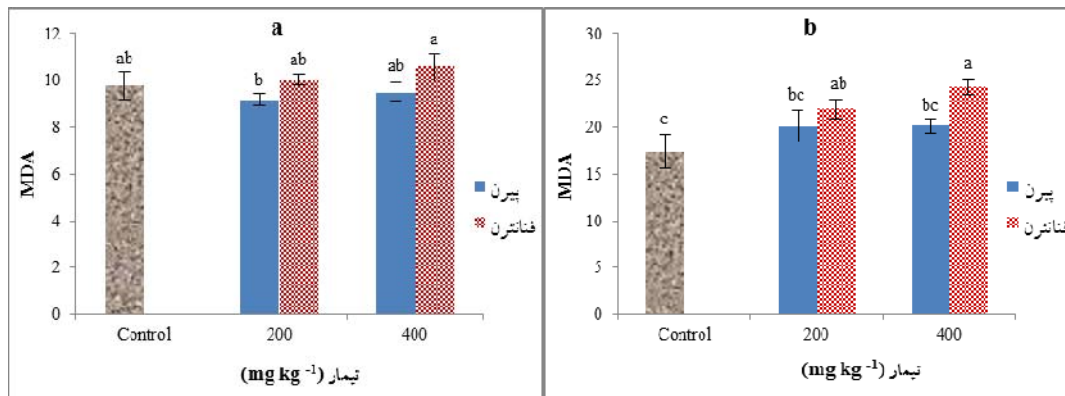
شاخص تمامیت غشاء (MSI): پیرن تأثیر معنی‌داری بر شاخص تمامیت غشای اندام‌های هوایی و ریشه نداشت، اما فناترن باعث کاهش این شاخص هم در اندام‌های هوایی و هم در ریشه گردید ($p \leq 0/05$). کاهش شاخص تمامیت غشاء تحت تیمار فناترن در ریشه بیشتر از



شکل ۳- تأثیر فناترن و پیرن بر شاخص تمامیت غشاء (MSI) در اندام‌های هوایی (a) و ریشه (b) گیاه گندم. حروف یکسان نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است (n=۳).

گیاهان شاهد و تیمار شده با پیرن گردید. فناترن به ترتیب باعث افزایش ۲۰/۸۹ و ۲۸/۴۴ درصدی غلظت مالون دی-آلدئید ریشه در غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ mg kg⁻¹ نسبت به گیاهان شاهد گردید (شکل ۴).

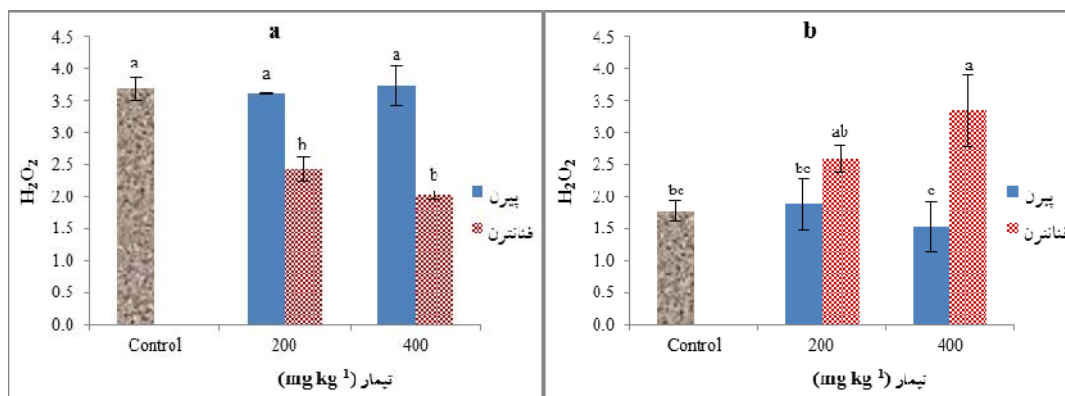
مالون دی‌آلدئید (MDA): هیچیک از دو ترکیب فناترن و پیرن تأثیر معنی‌داری بر غلظت مالون دی‌آلدئید اندام‌های هوایی نداشتند ($p \leq 0/05$), ولی در ریشه فناترن باعث افزایش معنی‌دار غلظت مالون دی‌آلدئید در مقایسه با



شکل ۴- تأثیر فناترن و پیرن بر غلظت مالون دی آلدئید در اندامهای هوایی (a) و ریشه (b) گیاه گندم. حروف یکسان نشان دهنده عدم تفاوت معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد است.

در اندامهای هوایی باعث کاهش ۳۴/۱۴ و ۴۴/۹۸ درصدی و در ریشه باعث افزایش ۳۱/۰۰ و ۴۶/۷۰ درصدی مقدار پراکسید هیدروژن به ترتیب در غلظت ۲۰۰ و ۴۰۰ mg kg⁻¹ در مقایسه با گیاهان شاهد گردید (شکل ۵).

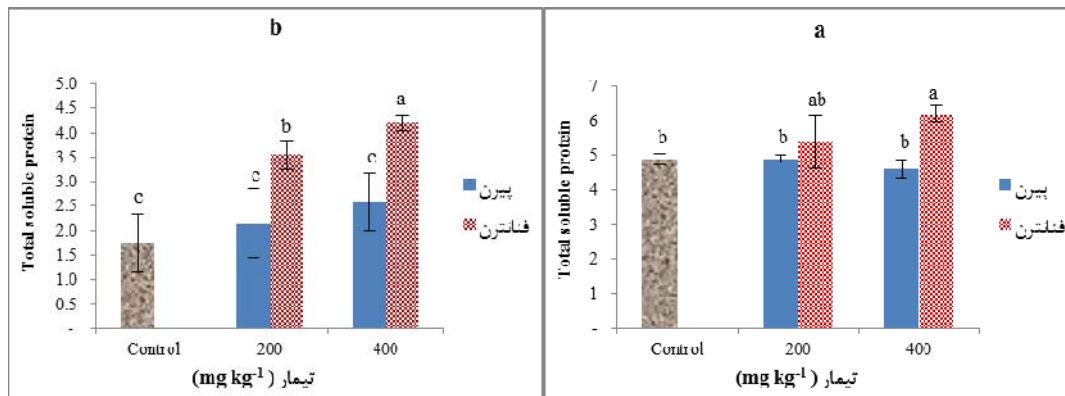
پراکسید هیدروژن (H₂O₂): پیرن تأثیر معنی داری بر محتوای پراکسید هیدروژن اندامهای هوایی و ریشه گیاهان نداشت، اما فناترن باعث کاهش معنی دار پراکسید هیدروژن اندامهای هوایی و برعکس افزایش معنی دار این ماده در ریشه در مقایسه با شاهد گردید (p ≤ ۰/۰۵). فناترن



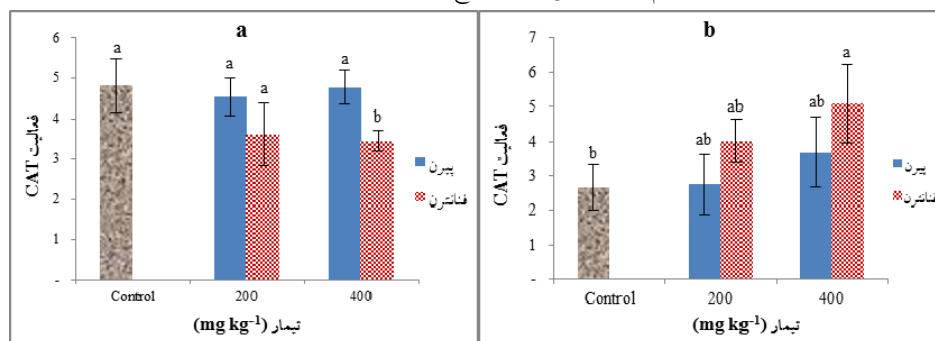
شکل ۵- تأثیر فناترن و پیرن بر غلظت پراکسید هیدروژن در اندامهای هوایی (a) و ریشه (b) گیاه گندم. حروف یکسان نشان دهنده عدم تفاوت معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد است.

فعالیت آنزیمهای پاداکساینده: پیرن تأثیر معنی داری بر فعالیت آنزیم CAT در اندامهای هوایی و ریشه نداشت، اما فناترن باعث کاهش فعالیت این آنزیم در اندامهای هوایی و افزایش فعالیت آن در ریشه گردید. کاهش فعالیت این آنزیم در اندامهای هوایی (۲۸/۲۷ درصد) و افزایش فعالیت آن در ریشه (۵۲/۲۵ درصد) در سطح ۴۰۰ mg kg⁻¹ معنی دار بود (p ≤ ۰/۰۵) (شکل ۷).

محتوای پروتئین محلول کل: پیرن هم در اندامهای هوایی و هم در ریشه تأثیر معنی داری بر محتوای پروتئین محلول کل نداشت، اما فناترن باعث افزایش معنی دار محتوای پروتئین کل در اندامهای هوایی و با شدت بیشتر در ریشه گردید (p ≤ ۰/۰۵) (شکل ۶). فناترن در سطح ۴۰۰ mg kg⁻¹ باعث افزایش ۲۰/۹۶ و ۵۸/۳۳ درصدی پروتئین محلول کل به ترتیب در اندامهای هوایی و ریشه شد.



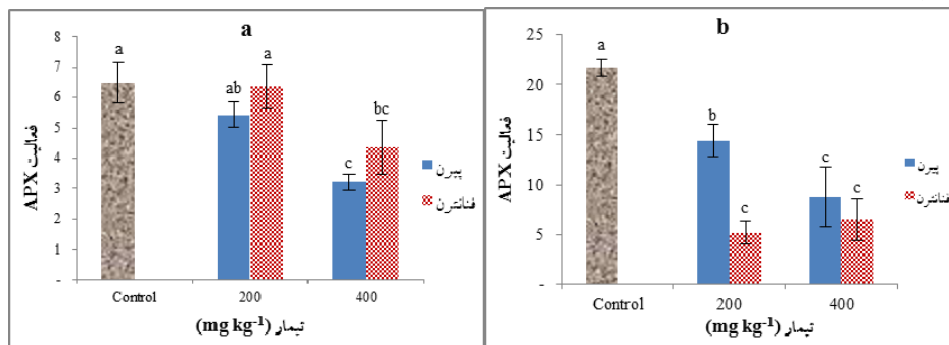
شکل ۶- تأثیر فناثرن و پیرن بر محتوای پروتئین محلول (mg gr⁻¹ FW) در اندام‌های هوایی (a) و ریشه (b) گیاه گندم. حروف یکسان نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.



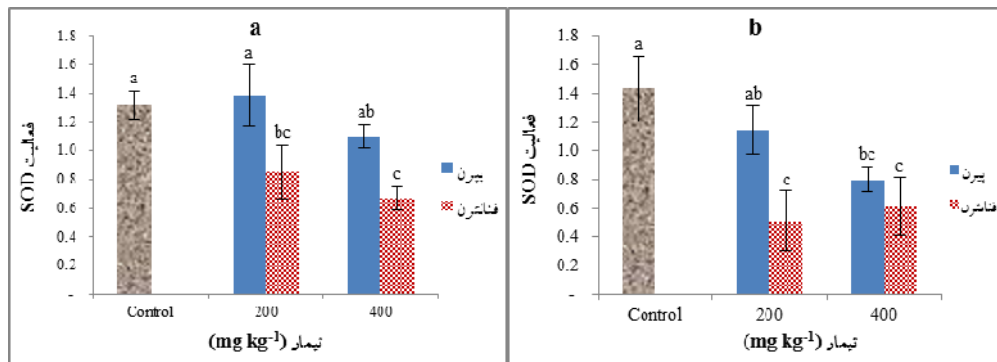
شکل ۷- تأثیر فناثرن و پیرن بر فعالیت آنزیم CAT در اندام‌های هوایی (a) و ریشه (b) گیاه گندم. حروف یکسان نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.

اندام‌های هوایی بر فعالیت آنزیم‌های SOD و POD معنی‌دار نبود ولی فناثرن به طور معنی‌داری باعث کاهش فعالیت این دو آنزیم گردید (شکل ۹a و ۱۰a). الگوی تغییرات دو آنزیم SOD و POD در ریشه نیز شبیه تغییرات APX تحت تیمار دو آلاینده بود (شکل ۸b و ۱۰b).

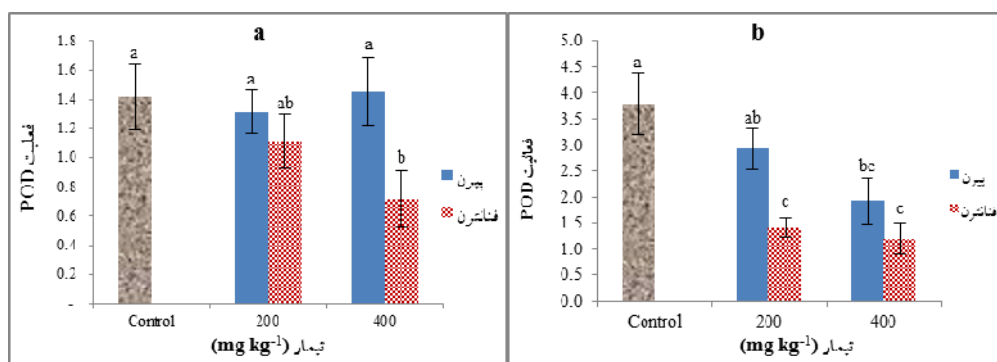
هر دو تیمار باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های APX، SOD و POD هم در اندام‌های هوایی و هم در ریشه گیاه گردیدند که این تغییر در ریشه شدیدتر از اندام‌های هوایی بود. در اندام‌های هوایی پیرن و فناثرن در سطح ۴۰۰ mg kg⁻¹ باعث کاهش به ترتیب ۵۳/۵۰ و ۹۷/۳۲ درصدی و در ریشه به ترتیب باعث کاهش فعالیت ۹۱/۵۹ و ۹۹/۶۹ درصدی APX گردیدند (شکل ۸). تأثیر پیرن در



شکل ۸- تأثیر فناثرن و پیرن بر فعالیت آنزیم APX در اندام‌های هوایی (a) و ریشه (b) گیاه گندم. حروف یکسان نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.



شکل ۹- تأثیر فنانترون و پیرن بر فعالیت آنزیم SOD در اندامهای هوایی (a) و ریشه (b) گیاه گندم. حروف یکسان نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.



شکل ۱۰- تأثیر فنانترون و پیرن بر فعالیت آنزیم POD در اندامهای هوایی (a) و ریشه (b) گیاه گندم. حروف یکسان نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.

Cicer arietinum) (۱۶) و *آرابیدوپسیس تالیانا* (۱۸) قبلاً

نیز گزارش شده است. از طرفی، در مطالعات دیگر بعضی گیاهان از جمله سورگوم (*Sorghom vulgare*) در برابر فنانترون مقاوم می‌باشند و کاهش رشد معنی‌دار نشان نمی‌دهند (۳). پیرن تأثیر معنی‌داری در مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی نداشت، اما فنانترون باعث کاهش معنی‌دار این رنگیزه‌ها گردید. کاهش معنی‌دار رنگیزه‌های فتوسنتزی در تیمار فنانترون در گیاه گندم (۲۰ و ۲۲) و *آرابیدوپسیس تالیانا* (۱۸) قبلاً مشاهده شده است. از آنجایی که محتوای کلروفیل، مشخصه مؤثری در فعالیتهای فتوسنتزی می‌باشد و عموماً به عنوان شاخصی برای نشان دادن شدت تنش در گیاهان استفاده می‌شود (۳)، بنابراین براساس داده‌های به-دست آمده از این پژوهش می‌توان گفت که فنانترون در مقایسه با پیرن برای گیاه گندم بیشتر تنش‌زا می‌باشد. پیرن تأثیر معنی‌داری بر شاخص تمامیت غشای اندامهای هوایی

بحث

فنانترون و پیرن باعث کاهش رشد گیاه گندم شدند، ولی اثر بازدارندگی ترکیب فنانترون بسیار بیشتر از پیرن بود. پیرن در غلظتهای بالاتر از 300 mg kg^{-1} اثرات معنی‌داری در بازدارندگی رشد گیاه گندم نسبت به شاهد از خود نشان داد، در حالی که فنانترون اثرات بازدارندگی خود را حتی از سطح 100 mg kg^{-1} نیز نشان داد. در تیمار پیرن بین غلظتهای مختلف اعمال شده تفاوت معنی‌داری وجود نداشت، ولی این اختلاف بین تیمارهای فنانترون مشاهده شد که حاکی از اثرات بازدارندگی قوی‌تر فنانترون متناسب با افزایش غلظت می‌باشد. کاهش رشد گیاهان در حضور ترکیبات آروماتیک چند حلقه‌ای (PAHs) در گیاه گندم (۲۲ و ۲۴)، برنج (*Oryza sativa* L.) (۱۷)، یونجه (*Medicago sativa*) (۱۹)، ذرت (*Zea mays*)، نخود

CAT در گندم، یونجه و آفتاب‌گردان (*Helianthus annuus*) تیمار یافته با فنانترون قبلاً گزارش شده است (۲۲).

عموماً شرایط تنش باعث افزایش رادیکالهای اکسیژن فعال و فعال شدن فرآیندهای مخرب غشاء گردیده و منجر به اکسایش لیپیدهای غشاء می‌شود (۱، ۸ و ۲۳). طبق نتایج حاصل از سنجش غلظت H_2O_2 ، MDA، شاخص تمامیت غشاء و فعالیت آنزیمهای پاداکساینده در این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت که فنانترون و تا حدودی پیرن از طریق ایجاد تنش اکساینده باعث اختلال در رشد گیاه گندم می‌شوند که علائم تنش در ریشه شدیدتر از اندامهای هوایی می‌باشد. از آنجایی که حلالیت فنانترون در آب ($mg\ l^{-1}$ ۱/۱۸ در ۲۵ درجه سانتی‌گراد) بیشتر از پیرن ($mg\ l^{-1}$ ۰/۱۲ در ۲۵ درجه) می‌باشد، بنابراین به نظر می‌رسد که فنانترون بیشتر از پیرن می‌تواند جذب گیاه شود. از سوی دیگر، در داخل گیاه نیز پیرن به علت چربی دوستی بیشتر تمایل به باقی ماندن در ریشه دارد و کمتر به اندامهای هوایی انتقال می‌یابد (۱۴)، بنابراین فنانترون بیشتر از پیرن می‌تواند در گیاه باعث ایجاد تنش گردد. در یک بررسی دیگر نشان داده شده که فنانترون باعث اختلال در رشد و تکامل ریشه می‌شود و از این رو به واسطه ایجاد اختلال در جذب مواد باعث اختلال در متابولیسم و به تبع آن ایجاد تنش و کاهش رشد گیاه می‌شود (۱۲).

نتیجه گیری نهایی

نتایج این پژوهش نشان داد که فنانترون و تا حدودی پیرن به عنوان دو ماده سمی می‌توانند توسط ریشه، جذب گیاه گندم شوند و از طریق ایجاد اختلال در عملکرد ریشه که از یکی علائم آن می‌تواند کاهش تمامیت غشای ریشه باشد، باعث ایجاد تنش در اندامهای هوایی گردد. علائم این تنش به صورت کاهش رنگیزه‌های فتوسنتزی و به تبع آن فتوسنتز، اختلال در عملکرد آنزیمهای پاداکساینده و در نتیجه آن افزایش مواد اکساینده و در نهایت کاهش رشد

و ریشه نداشت ولی فنانترون باعث کاهش معنی‌دار این شاخص در اندامهای هوایی، به خصوص ریشه گردید. تغییر در شاخص تمامیت غشاء دارای همبستگی منفی و معنی‌داری با میزان تغییرات در غلظت مالون دی‌آلدئید در اندامهای هوایی ($r^2 = 0/992$ و $p = 0/0548$) و ریشه ($r^2 = 0/939$ و $p = 0/158$) بود. همچنین همبستگی منفی معنی‌داری نیز بین غلظت H_2O_2 ریشه و کاهش در شاخص تمامیت غشاء ($r^2 = 0/994$ و $p = 0/048$) وجود داشت. صدمه ناشی از عوامل تنش زای محیطی نظیر گرما، سرما، خشکی، شوری و بسیاری از عوامل تنش زای محیطی در مرحله اول بر روی غشاهای سلولی قابل مشاهده است (۴). این نتایج نشان می‌دهند که تنش اکساینده ناشی از سمیت این ترکیبات باعث آسیب به غشاهای سلولی و در نتیجه کاهش تمامیت آنها گردیده است. از طرف دیگر چون محتوای پروتئین کل در گیاهان تیمار شده با فنانترون که بیشتر علائم تنش را نشان دادند، به طور معنی‌داری افزایش یافت، به نظر می‌رسد که احتمالاً این عمل یک سازوکار سازشی در برابر تنش باشد که هم پروتئینهای آسیب دیده را جایگزین می‌کند و هم آنزیمهای پاداکساینده زیادی را تولید کند (۲۴).

پیرن در اندامهای هوایی تأثیر معنی‌داری بر فعالیت آنزیمهای پاداکساینده نداشت، اما فنانترون باعث کاهش فعالیت هر چهار آنزیم بررسی شده در اندامهای هوایی گردید. در ریشه هر دو ترکیب باعث کاهش فعالیت سه آنزیم APX، POD و SOD و افزایش فعالیت آنزیم CAT گردیدند که تأثیر فنانترون در این تغییرات نیز بیشتر از پیرن بود. نتایج متفاوتی از تأثیر PAHs بر فعالیت آنزیمهای پاداکساینده در گیاهان گزارش شده است. Liu و همکاران (۲۰۰۸) در *آرابیدوپسیس تالیانا* نشان داده‌اند که فنانترون باعث افزایش فعالیت سه آنزیم APX، POD و SOD گردیده ولی تأثیری در فعالیت آنزیم CAT نداشته است (۱۸). در یونجه (*Medicago sativa*) فنانترون باعث افزایش فعالیت آنزیم POD (۱۹ و ۲۲) گردیده و کاهش فعالیت

آلوده به هیدروکربنهای آروماتیک چند حلقه باید مورد توجه قرار گیرد.

گیاه ظاهر می‌گردد. با توجه به نتایج به دست آمده از این پژوهش، چون گیاه گندم یک گیاه حساس در برابر حداقل فنانتین می‌باشد، این موضوع در کشت گندم در خاکهای

منابع

۳- علایی، ا.، وکیلی، ف. و مهردادشریف، ا.ع. (۱۳۸۹). گیاه‌پالایی خاکهای آلوده به "فنانتین" با استفاده از گیاه سورگوم. محیط شناسی. جلد ۵۳: ۷۹-۸۸.

۱- رحیمی تشی، ط. و نیکنام، و. (۱۳۹۴). بررسی تأثیر پیش تیمار سالیسیلیک اسید بر برخی پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گندم (*Triticum aestivum* L.) به تنش شوری. مجله پژوهش‌های گیاهی. جلد ۲۸: ۲۸-۳۰۶-۲۹۷.

۴- عمو آقایی، ر.، قربان نژاد نی ریزی، ه. و مستاجران، ا. (۱۳۹۳). بررسی اثر شوری بر رشد گیاهچه، میزان کلروفیل، محتوای نسبی آب و پایداری غشا در دو رقم کلزا. مجله پژوهش‌های گیاهی. جلد ۲۷: ۲۵۶-۲۶۸.

۲- صابونچی محمدی، ف.، صالحی لیسار س.ی. و مسن هرزندی، ا. (۱۳۹۳). اثرات فیزیولوژیک تنش ناشی از سمیت فنانتین در گیاه گندم رویش یافته در خاکهایی با بافت متفاوت. مجله فیزیولوژی تنش گیاهان. جلد ۱۰: ۱-۱۰.

5- Aina, R., Palin, L. and Citterio, S. (2006). Molecular evidence for benzo[a]pyrene and naphthalene genotoxicity in *Trifolium repens* L.. Chemosphere. 65: 666-673.

(2016). Effect and localization of phenanthrene in maize roots. Chemosphere. 149: 130-136.

6- Alkio, M., Tabuchi, T.M., Wang, X. and Colon-Carmona A. (2005). Stress responses to polycyclic aromatic hydrocarbons in Arabidopsis include growth inhibition and hypersensitive response-like symptoms. Journal of Experimental Botany. 56: 2983-2994.

13- Foyer, C.H. and Noctor, G. (2005). Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. Plant Cell and Environment. 28: 1056-1071.

7- Arnon, D.J. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiology. 24: 1-15.

14- Fuxing K, Dongsheng C, Yanzheng G, Yi Z. 2010. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in subcellular root tissues of ryegrass. BMC Plant Biology. 10: 210-216.

8- Artetxe, U., Garcia-Plazaola, J.I., Hernandez, A. and Becerril, J.M. (2002). Low light grown duckweed plants are more protected against the toxicity induced by Zn and Cd. Plant Physiology and Biochemistry. 40: 859-863.

15- Harinasut, P., Poonsopa, D., Roengmongkol, K. and Charoensalaporn, R. (2003). Salinity effects on antioxidant enzymes in mulburg cultivar. Science Asia. 29: 109-113.

9- Boominathan, R. and Doran, P.M. (2002). Ni-induced oxidative stress in roots of the Ni hyperaccumulator, *Alyssum bertoloni*. New Phytologist. 156: 205-215.

16- Kummerova, M., Zezulka, S., Vanova, L. and Fiserova, H. (2012). Effect of organic pollutant treatment on the growth of pea and maize seedlings. Central European Journal of Biology. 7: 159-166.

10- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 72: 248-254.

17- Li, J.H., Gao, Y., Wu, S.C., Cheung, K.C., Wang, X.R. and Wong, M.H. (2008). Physiological and biochemical responses of rice (*Oryza sativa* L.) to phenanthrene and pyrene. International Journal of Phytoremediation. 10: 106-118.

11- Chance, B. and Maehly, A.C. (1955). Assay of catalases and peroxidases: methods in enzymology, pp. 764-775. New York, Academic Press.

18- Liu, H., Weisman, D., Yuan-bei, Y., Cui, B., Huang, Y., Colon-Carmona, A. and Wang, Z. (2008). An oxidative stress response to polycyclic aromatic hydrocarbon exposure is rapid and complex in *Arabidopsis thaliana*. Plant Science. 176: 375-382.

12- Dupuy, J., Leglize, P., Vincent, Q., Zelko, I., Mustin, C., Ouvrard, S. and Sterckeman, T.

- 19- Muratova, A.Y., Kapitonova, V.V., Chernyshova, M.P. and Turkovskaya, O.V. (2009). Enzymatic Activity of alfalfa in a phenanthrene-contaminated environment. World Academy of Science, Engineering and Technology. 3: 545-550.
- 20- Obinger, C., Maj, M., Nicholls, P. and Loewen, P. (1997). Activity, peroxide compound formation, and heme d synthesis in *Escherichia coli* HPII catalase. Archives of Biochemistry and Biophysics. 342: 58-67.
- 21- Sairam, R.K., Veerabhadra Rao, K. and Srivastava, G.C. (2002). Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. Plant Science, 163: 1037-1046.
- 22- Salehi-Lisar, S.Y. and Deljoo S. (2015). Physiological effect of phenanthrene on *Triticum aestivum*, *Helianthus annuus* and *Medicago sativa*. EurAsian Journal of BioSciences. 9: 29-37.
- 23- Sofo, A., Dichio, B., Xiloyannis, C. and Masia, A. (2004). Effects of different irradiance levels on some antioxidant enzymes and on malondialdehyde content during rewatering in olive tree. Plant Science. 106: 293-300.
- 24- 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.). Ecotoxicology and Environmental Safety. 109: 110-115.
- 25- Winterbourn, C.C., Mc Grath, B.W. and Carrell, R.W. (1976). Reactions involving superoxide and normal unstable hemoglobins. Biochemical Journal. 155: 493-502.

Study of phenanthrene and pyrene effects on photosynthetic pigments, membrane stability and antioxidant enzymes activities in wheat (*Triticum aestivum* L.)

Sobhani A., SalehiLisar S.Y. and Movafeghi A.

Dept of plant Biology, Faculty of Natural Science, University of Tabriz, Tabriz, I.R. of IRAN

Abstract

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are an important group of pollutants which are released into the environment mainly due to incomplete combustion of organic materials. PAHs frequently detected at relatively high concentrations in soils of some regions and are toxic for organisms including plants. In this study, wheat plants were grown hydroponically and treated by different concentrations of phenanthrene and pyrene. After determination of effective levels of two compounds, their effects on some physiological and biochemical parameters were evaluated. While pyrene showed no significant effect on studied parameters, phenanthrene significantly decreased photosynthetic pigments content and membrane stability index of shoot and root. Also, phenanthrene significantly increased malondialdehyde content of shoot and root; and hydrogen peroxidase content of root but decreased hydrogen peroxidase of shoot. Phenanthrene significantly decreased CAT, POD, SOD and APX activity in shoot, while pyrene only decreased APX activity. Both compounds decreased CAT, POD, SOD and APX activity in root, but the effect of phenanthrene was higher than that of pyrene. According to the results of this study, phenanthrene inhibited antioxidant enzymes activities and caused oxidative stress more than that of pyrene, and therefore led to higher reduction in photosynthetic pigments, plasma membrane integrity and ultimately plant growth.

Key words: Antioxidant enzymes, Phenanthrene, Pyrene, Wheat.