اثر نفتالین بر برخی ویژگی‌های ریختی و فیزیولوژیک گیاه آفتابگردان (*Helianthus annuus*)

بنفشه معماریان، مریم خوش سخن مظفر*

گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، قم

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۲۱، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۷/۰۶/۰۴)

چکیده

هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای از مهم‌ترین عوامل به‌وجودآورنده تنش هستند که از رشد گیاهان ممانعت نموده و با اختلال در تعادل بین تولید گونه‌های فعال اکسیژن و فعالیت‌های دفاعی آنتی‌اکسیدان گیاه، ایجاد تنش اکسیداتیو می‌کنند. نفتالین از اصلی‌ترین آلاینده‌هاست که در صنعت پتروشیمی رو به افزایش است و در فهرست آلوده‌کننده‌های سمی اصلی قرار دارد. با توجه به مواجهه اجتناب ناپذیر گیاه ارزشمند آفتابگردان با این آلودگی آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. دانه‌رست‌هایی که در شرایط عادی رشد کردند به محیط هیدروپونیک منتقل شدند و بعد از ۱٤ روز تیمار با نفتالین با غلظت‌های ۳۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر، اندام هوایی و ریشه این گیاهان برداشت شدند و جهت بررسی آناتومیکی و بیوشیمیایی استفاده شدند. میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (SOD, PO, APX) و میزان مالون‌دی‌آلدهید در تیمار نفتالین نسبت به شاهد افزایش داشت. همچنین میزان کلروفیل a و b در غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر نفتالین افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد داشت. با افزایش نفتالین در ریشه و سیاه‌شدن آن و از بین‌رفتن تارهای کشنده، جذب عناصر دچار مشکل شد و در ادامه پژمردگی گیاه، کاهش رشد اندام هوایی، کوچک‌شدن برگ‌ها و ایجاد علائم لکه‌های سفید و نکروز را به‌همراه داشت. در پی مکانیسم‌های دفاعی گیاه در برابر تیمار نفتالین، تراکم کرک‌های ساقه افزایش یافته و همچنین گسترش آوندهای چوبی در ساقه تسریع گشت.

واژه‌های کلیدی: تنش اکسیداتیو، گیاه آفتابگردان، محیط هیدروپونیک، نفتالین

مقدمه

به‌دلیل شهرنشینی و صنعتی‌شدن، هیدروکربن‌های آروماتیکی چندحلقه ای Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) به‌طور فزاینده‌ای باعث آلودگی در اکوسیستم شده‌اند (Srogi, 2007). PAHs را می‌توان در دود حاصل از اگزوز، سیگار، خودرو، قطران زغال سنگ، آسفالت، آتش‌سوزی، سوزاندن محصولات کشاورزی و مکان‌های دفن زباله‌های خطرناک مشاهده کرد. برخی PAHs برای ساخت رنگ‌های پلاستیک و آفت‌کش‌ها و بعضی حتی در داروها مورد استفاده قرار می‌گیرند (Ma *et al.*, 2010). طبق پدیده Hormesis، عکس العمل موجودات در پاسخ به تنش، به‌صورت تحریک در غلظت (دوز) پایین و مهار در غلظت می‌باشد (Calabrese and Blain, 2009). براساس این اصل، اثر PAHs بر گیاهان تحت تأثیر غلظت است، به‌طوریکه مواجهه با غلظت‌های پایین PAHs، می‌تواند وزن گیاه را افزایش دهد و بالعکس غلظت‌های بالای PAHs مهارکننده رشد گیاهان است (Ma *et al.*, 2010)، این نوع تأثیر خاص PAHs در گیاهان *Lemna minor* و *Lactuca sativa* نشان داده شده است (Belz *et al.*,

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: m.khoshm@gmail.com

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.21.9]

2008). در گیاه آرابیدوپسیس، علائم ریخت‌شناختی تنش PAHs، به‌صورت کاهش رشد ریشه و جوانه، تغییر در کرک‌ها، رشد ناقص تارهای کشنده، کلروز، گلدهی دیررس و ظهور لکه‌های سفید رنگ گزارش شده‌اند (Alkio *et al*., 2005). PAHs می‌توانند از غشای سلول عبور کنند، میزان آب و بهره‌وری از مواد مغذی را کاهش داده و فعالیت‌های فتوسنتزی و انتقال الکترون را مختل کنند (Ma *et al*., 2010). مهار فتوسنتز، غالباً مکانیسم کلیدی مسموم‌کننده در گیاهان است. تحقیقات نشان می‌دهند که PAHs باعث مشکل در تنفس و آسیب عمومی غشا می‌شوند. در سطح کل گیاه، نتیجه آن می‌تواند رشد معیوب گیاه، محصول کمتر و از دست‌دادن منافع رقابتی در میدان باشد (Zhang *et al*., 2010). براساس نتایج Lin و همکاران (۲۰۰٦)، جابه‌جایی PAHs مانند فنانترین و پیرن، توسط جریان آپوپلاستی از طریق دیواره‌های سلولی انجام می‌شود و تنها حجم کوچکی از ترکیب، در واکوئل‌های سلولی با جابجایی سیمپلاستی منتقل می‌شود (Lin *et al*., 2006). نتایج Li و همکاران (۲۰۰۸) در مورد منحنی‌های جذب وابسته به غلظت فنانترین و پیرن در ریشه‌های زنده و مرده برنج، همین مورد را تأیید می‌کند (Li *et al*., 2008). در تعدادی از کارهای تحقیقاتی نشان داده شده که بعضی گیاهان مانند صنوبر (Rentz *et al*., 2003)، گندم، جودوسر، ذرت (Aprill and Sims, 1990)، آفتابگردان، سویا، نخود، کانولا و هویج (Liste and Alexander, 2000) می‌توانند آلاینده‌های نفت خام را در خاک تحمل می‌کنند. همچنین درسال ۲۰۰۲ حذف نفتالین از آب توسط گیاه پیکانسر (*Sagittaria* sp.) نشان داده شد (Maillacheruvu and Safaai, 2002). واکنش‌های تنشی به PAHs (فنانترن) در گیاه آرابیدوپسیس باعث بازداری از رشد و علائم حساسیت بالا (HR) می‌گردد (Alkio *et al*., 2005). همچنین تحقیقات نشان داد ترکیبات آروماتیکی چندحلقه‌ای در غلظت‌های ۰/۰۲ تا ۲ میکرومولار باعث کاهش جوانه‌زنی در گیاهان لوبیا، خردل و گندم می‌گردد (Paskova *et al*., 2006). تنش PAHs در گیاه باعث می‌شود بافت و سلول، تحت فشار اکسیداتیو قرار گیرد (Alkio *et al*., 2005). بطورکلی تنش‌های محیطی گوناگون و محرک‌های داخلی سبب اختلال در رداکس از طریق افزایش تولید ROS (گونه‌های اکسیژن واکنشی) یا کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌گردند که به‌همین سبب تنش آنتی‌اکسیدانی رخ می‌دهد (Gallego, 1996). آنزیم‌هایی مانند سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و گلوتاتیون ترنسفراز مسئول حذف ROS در بخش‌های مختلف سلولی‌اند (Jimenez *et al*., 1997). تأثیر فنانترن بر گیاه آرابیدوپسیس نشان داد فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز، کاتالاز و گلوتاتیون ترنسفراز و همچنین میزان شاخص مالون‌دی‌آلدهید و هیدروژن پراکسید در اثر تنش افزایش می‌یابد اما با افزایش غلظت فنانترن از میزان کلروفیل a و b کاسته می‌شود (Liu *et al*., 2009).

نفتالین با فرمول شیمیایی $C_{10}H_8$، جرم مولکولی ۱۲۸/۱۷ گرم بر مول، نقطه جوش ۲۱۸ درجه سانتی‌گراد، نقطه ذوب ۸۰/۲٦ درجه سانتی‌گراد، یکی از انواع PAH است (IARC, 2002). نفتالین ماده‌ای سفید و جامد است که به‌طور طبیعی در سوخت‌های فسیلی یافت می‌شود. مطالعات Zhang و همکاران (۲۰۱۰) نشان داد نفتالین در دانه‌رست‌های چهار گونه گیاهی *Baumea juncea*, *Baumea articulata*, *Schoenoplectus validus* و *Juncus subsecundus* باعث کاهش رشد ریشه و ساقه، تغییر شکل کرک‌ها، اختلال در رشد و تکوین تارکشنده، کلروز، گلدهی دیررس و ظهور لکه‌های سفید می‌شود (Zhang *et al*., 2010).

آفتابگردان با نام علمی *Helianthus annuus* L. از خانواده Asteraceae گیاهی یک ساله و دارای ساقه راست، خشن و به ارتفاع دو متر (گاهی بیشتر) است که به‌عنوان گیاه زینتی کاربرد دارد، دانه‌های روغنی آن مورد استفاده قرار می‌گیرد و در کشورهای مختلف پرورش می‌یابد (Rahimizadeh *et al*., 2007). پیش از این کاربرد این گیاه برای پاک‌سازی آلاینده‌های آلی و غیرآلی از محیط نشان داده شده است (Heidari, 2013; Prasad, 2007). این گیاه قادر به تغییر شکل هیدروکربن‌های آروماتیک می‌باشد (Castro *et al*., 2003; Adamia *et al*.,

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.21.9]

2006) و به‌دلیل سیستم ریشه‌ای وسیع، آفتابگردان بهترین کاندیدا برای پاک‌سازی رادیونوکلئوتیدها و فلزات از آب معرفی شده است (Dushenkov *et al.*, 1997 a, b). نشان داده شده است آبیاری گیاه آفتابگردان با آب آلوده به شوینده‌های خانگی در غلظت بالا، بر جوانه‌زنی و مراحل اولیه رشد گیاه تأثیر منفی می‌گذارد (Heidari, 2013). با این وجود تحقیقی در زمینه تأثیر نفتالین بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی و مخصوصاً تغییرات آناتومیکی و ظاهری در گیاه آفتابگردان انجام نشده است. با توجه به اهمیت اقتصادی (تغذیه‌ای و زینتی) این گیاه و همچنین مواجهه اجتناب‌ناپذیر گیاهان با آلودگی‌های زیست‌محیطی، در این تحقیق تأثیر هیدروکربن حلقوی نفتالین بر رشد، وضعیت ظاهری، ویژگی‌های آناتومیکی و فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاه افتابگردان بررسی شد.

مواد و روش‌ها

تهیه گیاه و کشت بذر و گیاه کامل: بذرهای گیاه آفتابگردان (*H. annuus*) از شرکت دانه‌های روغنی قم تهیه شده و پس از ضدعفونی و شسته‌شدن، در پتری‌دیش جوانه زدند. پس از رشد کافی دانه‌رست (۹ روز)، دانه‌رست‌ها به محیط هیدروپونیک منتقل شده و به‌مدت دو هفته جهت سازگاری رشد داده شدند (در نور ۶۰۰۰ لوکس، دمای ۳±۲۷ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۸ ساعت تاریکی، ۱۶ ساعت روشنایی). سپس گیاهان به سه گروه تقسیم شدند، ۱- شاهد، ۲- تیمار ۳۰ میلی‌گرم در لیتر نفتالین ۳- تیمار ۵۰ میلی‌گرم در لیتر نفتالین (Zhang *et al.*, 2010). هر گروه دارای سه گلدان مستقل و هر گلدان دارای ۷ گیاه بود. محلول هیدروپونیک در گلدان‌ها به‌طور مستمر با پمپ هوادهی می‌شد و هر روز میزان محیطی که مصرف شده، اضافه گشته و هر ۵ روز یک‌بار محیط عوض می‌شد.

محلول غذایی تغییریافته هوگلند (۱/۲) دارای عناصر پرمصرف و کم‌مصرف به شرح زیر (pH=۶) می‌باشد (Hoagland, 1950):

(مقادیر بر حسب میلی‌مول):

$Ca(NO_3)_2.\ 4H_2O$: 2.5; KNO_3: 2.5; $MgSO_4.\ 7H_2O$: 1; KH_2PO_4: 0.5

(مقادیر بر حسب ppm):

Fe-EDTA: 3; H_3BO_3: 0.5; Mn ($MnCl_2$): 0.5; Zn ($ZnCl_2$): 0.05

Cu ($CuCl_2.\ 2H_2O$): 0.02; Mo (Na_2MoO_4): 0.02

پس از ۱۴ روز تیمار، ریشه گیاهان برداشت‌شده جهت حذف آلودگی سطحی نفتالین، با آب‌مقطر شسته شدند. گیاهان از نظر ظاهری، تارهای کشنده ریشه و میزان کرک‌های ساقه بررسی شدند، همچنین بخش‌های مشابهی از ساقه و ریشه جهت بررسی آناتومیکی حدود یک ماه در محلول F.A.A (فرمالدئید، استیک اسید واتانول) تثبیت شدند. اندام هوایی از ناحیه یقه از ریشه جدا شده و ریشه و ساقه به‌طور جداگانه جهت انجام ویژگی‌های فیزیولوژیکی با نیتروژن مایع منجمد شده و تا زمان انجام آنالیزهای بیوشیمیایی در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

برش‌گیری و مطالعات میکروسکوپی: به‌منظور انجام مطالعات میکروسکوپی از نمونه‌های گیاهی تثبیت‌شده در F.A.A، در قسمت ساقه برش دستی تهیه شد. در برش‌گیری سعی شد که از قسمت‌های همسان ساقه برش گرفته شود. برش‌های تهیه‌شده به روش رنگ‌آمیزی مضاعف، رنگ‌آمیزی و توسط میکروسکوپ نوری Nikon مدل Y100 ساخت ژاپن بررسی شدند.

بررسی فعالیت‌های بیوشیمیایی: سنجش فعالیت آنزیم‌های سوپر اکسید دسموتاز، آسکوربات پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز و پراکسیداز، همچنین میزان مالون‌دی‌آلدهید و پرولین بر روی ساقه و ریشه به‌صورت جداگانه و سنجش میزان کلروفیل در اندام هوایی صورت گرفت.

اندازه‌گیری غلظت پروتئین کل به‌روش برادفورد: محلول‌های پروتئینی استاندارد با BSA در غلظت‌های صفر، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیترتهیه شد. به‌منظور سنجش محتوای پروتئین، به ۱۰۰ میکرولیتر از هر یک از محلول‌های استاندارد یا نمونه (اندام هوایی و ریشه گیاهان مورد مطالعه)، ۱ میلی‌لیتر معرف برادفورد (بلوکوماسی بریلیانت) افزوده و به‌وسیله ورتکس کاملاً مخلوط شد. نمونه‌ها

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.21.9]

حدود دو دقیقه در دمای اتاق قرار گرفته و سپس دانسیته نوری آنها آن توسط اسپکتروفوتومتر مدل T60 U ساخت انگلستان در طول‌موج ۵۹۵ نانومترتعیین شد و با تهیه منحنی استاندارد حاصل، محتوای پروتئین نمونه‌ها محاسبه گردید (Bradford, 1976).

سنجش آنزیم‌های سیستم آنتی‌اکسیدان، سنجش آنزیم سوپراکسید دسموتاز (SOD): از نمونه‌های منجمدشده به میزان ۲۰۰ میلی‌گرم وزن تر از اندام هوایی و ریشه به‌طور جداگانه، در ۳ میلی‌لیتر بافر KH_2PO_4-K_2HPO_4 (pH=٦/١) حاوی ۰/۱ میلی‌مول EDTA ساییده و سپس با دور ۱۲۰۰۰g به‌مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد (تمام مراحل فوق در ٤ درجه سانتی‌گراد انجام شد). بخش روشناور حاصل برای سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) با روش فوتوشیمیایی استفاده شد (Cakmak, 1991).

۳ میلی‌لیتر مخلوط واکنش حاوی: ۱/۵سی‌سی بافر KH_2PO_4-K_2HPO_4 (pH=٦/١) حاوی ۰/۱ میلی‌مول EDTA، ۳۰۰ میلی‌مول Na_2CO_3، ۳۰۰ میلی‌مول L-methionin، ۳۰۰ میلی‌مول Nitro Blue Tetrazoliumchloride (NBT)، ۳۰۰ میلی‌مول ریبوفلاوین (riboflavin) و ۳۰۰ میلی‌مول عصاره آنزیمی تهیه شد و لوله‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه در معرض نور قرار گرفتند. سپس دانسیته نوری آن در ٥٦٠ نانومتر اندازه‌گیری شد. یک واحد فعالیت SOD براساس مقدار آنزیم مورد نیاز برای مهار ۵۰ درصد سرعت احیا NBT محاسبه و براساس تغییرات جذب در میلی‌گرم پروتئین بیان شد.

سنجش آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX): از نمونه‌های منجمدشده به‌میزان ۲۰۰ میلی‌گرم وزن تر از اندام هوایی وریشه به‌طور جداگانه، در ۳ میلی‌لیتر بافر KH_2PO_4-K_2HPO_4 (pH=٦/١) حاوی ۰/۱ میلی‌مول EDTA ساییده و سپس با دور ۱۲۰۰۰×g به‌مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد (تمام مراحل فوق در ٤ درجه سانتی‌گراد انجام شد). بخش روشناور حاصل برای سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) مورد استفاده قرار گرفت. ۳ میلی‌لیتر مخلوط واکنش حاوی: ١٦٠٠ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم (pH=٦) حاوی EDTA ۰/۱ میلی‌مول، آسکوربیک اسید ۵۰۰ میکرولیتر، H_2O_2 ۵۰۰ میکرولیتر و عصاره آنزیمی به‌میزان ٤٠٠ میکرولیتر تهیه و اکسیداسیون آسکوربات در طول‌موج ۲۹۰ نانومتر به‌مدت یک دقیقه سنجیده شد (Nakano and Asada, 1981) و فعالیت آنزیم براساس تغییرات جذب در میلی‌گرم پروتئین بیان شد.

سنجش آنزیم پراکسیداز محلول (SPO): از نمونه‌های منجمدشده به‌میزان ۲۰۰ میلی‌گرم وزن تر از اندام هوایی و ریشه به‌طور جداگانه، در ۳ میلی‌لیتر بافر KH_2PO_4-K_2HPO_4 (pH=٦/١) حاوی ۰/۱ میلی‌مول EDTA ساییده و سپس با دور ۱۲۰۰۰g به‌مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد (تمام مراحل فوق در ٤ درجه سانتی‌گراد انجام شد). بخش روشناور حاصل برای سنجش آنزیم پراکسیداز محلول استفاده شد. به‌منظور سنجش فعالیت پراکسیداز ۳ میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۱۹۵۰ میکرولیتر (pH=٦/١)، ۵۰۰ میکرولیتر گایاکول و۵۰۰ میکرولیتر هیدروژن پراکسید (H_2O_2) تهیه شد و سپس با افزودن به۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی دانسیته نوری آن در ٤٧٠ نانومتر به‌مدت یک دقیقه اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم بر حسب تغییرات جذب به‌نسبت mg پروتئین عصاره بیان گردید (Kjalke *et al*., 1992).

سنجش میزان غلظت مالون‌دی‌آلدهید: سنجش میزان غلظت مالون‌دی‌آلدهید براساس روش (De Vos *et al*., 1991) سنجیده شد. مالون‌دی‌آلدهید با تیوباربیتوریک اسید (TBA) تشکیل کمپلکس رنگی می‌دهد که غلظت آن با دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری می‌شود. نمونه‌های منجمدشده ۲۰۰ میلی‌گرم از ریشه نمونه‌های گیاهی در ۳ میلی‌لیتر محلول ۱۰ درصد (حجم/وزن) تری‌کلرو استیک اسید ساییده شد. سپس نمونه‌ها در ۳۰۰۰ دور به‌مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. به ۱ میلی‌لیتر از بخش روشناور حاصل، ۱ میلی‌لیتر تیوباربیتوریک اسید ۰/۵ درصد افزوده شد. مخلوط حاصل در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت و بلافاصله در یخ سرد شده و دوباره سانتریفیوژ گردید. دانسیته نوری نمونه‌ها در طول‌موج ۵۳۲ نانومتر و ٦٠٠ نانومتر تعیین

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.21.9]

شد. میزان MDA با استفاده از ضریب جذب ثابت $155\ mM^{-1}\ cm^{-1}$ و تفاوت جذب در دو طول‌موج ذکر شده براساس مولار مالون‌دی‌آلدهید بر گرم وزن تر (M MDA/ g FW) محاسبه شد.

سنجش میزان کلروفیل: ۲۰۰ میلی‌گرم از نمونه‌ها با ۳ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد به‌طور کامل ساییده شد. عصاره حاصل با قیف حاوی کاغذ صافی در بالن ژوژه ۲۵ میلی‌لیتری صاف شد. به‌منظور جمع‌آوری کامل کلروفیل نمونه، کاغذ صافی با استون ۸۰ درصد چندین بار شستشو داده شد و سپس محتوای بالن با استون به حجم ۲۵ میلی‌لیتر رسانده شد. دانسیته نوری عصاره کلروفیل در طول‌موج‌های ٦٦٣ و ٦٤٥ نانومتر خوانده شد (Horwitz *et al*., 1970). مقدار کلروفیل a و b نمونه‌ها مطابق معادله‌های زیر محاسبه گردید.

کلروفیل a = [12/7(D663) – 2/69(D645)]V/1000 W/g FW

کلروفیل b = [22/9(D645) – 4/68(D663)]V/1000 W/g FW

در این معادلات D نمایانگر جذب عصاره کلروفیل در طول‌موج ویژه مذکور، V حجم نهایی عصاره کلروفیل و W وزن تر بافت برگ بر حسب گرم می‌باشد.

سنجش پرولین: ۱۰۰ میلی‌گرم ماده گیاهی خشک با ۱۰ میلی‌لیتر سولفوسالیسیلیک اسید ۳ ٪ در یک هاون تا یکنواخت شدن کامل محلول (حدود پنج دقیقه) ساییده و سپس با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف گردید. برای بهتر انجام‌گرفتن کار از یک یا دو میلی‌لیتر محلول برای سائیدن استفاده کرده و پس از یکنواخت‌شدن، مابقی محلول را بدان افزوده و سائیده شد. بهتر است این عصاره به‌صورت تازه مورد استفاده قرار گیرد. به‌منظور اندازه‌گیری محتوی پرولین آزاد نمونه‌ها، با استفاده از پرولین منحنی استانداردی در محدوده بین صفر تا ١٦/١ (صفر، ٢/٣، ٤/٦، ١٦/١) میکروگرم رسم شد. ۲ میلی‌لیتر از هر یک از غلظت‌های تهیه‌شده را در لوله آزمایشی ریخته، سپس به هر کدام ۲ میلی‌لیتر محلول معرف نین‌هیدرین و ۲ میلی‌لیتر استیک اسید گلاسیال اضافه شد. در لوله شاهد از آب‌مقطر استفاده شد. لوله‌ها را به‌مدت یک ساعت در بن‌ماری ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده، پس از طی این زمان بلافاصله آنها در حمام یخ سرد شدند. پس از رسیدن به دمای محیط به هر لوله ٤ میلی‌لیتر تولوئن اضافه و ۲۰–۳۰ ثانیه ورتکس شد. محلول رنگی وارد مرحله فوقانی تولوئن شد. فاز فوقانی را جدا کرده و جذب آن توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر طول‌موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شده و در نهایت مقدار پرولین به‌صورت میکروگرم بر گرم وزن خشک ($\mu g\ g^{-1}$(d.w.) محاسبه گردید (Bate *et al*., 1973).

آنالیزهای آماری: کلیه آنالیزها با سه تکرار مستقل انجام گرفت و سپس نتایج به‌دست‌آمده از گروه‌ها به کمک نرم‌افزار SPSS ver. 21 و انجام تست Tukey مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از نرم‌افزار Excel داده‌ها تحلیل و نمودارهای مربوطه رسم شد. همچنین میزان معنی‌داربودن یا نبودن آنها در سطح احتمال $P \leq 0.05$ بررسی شد.

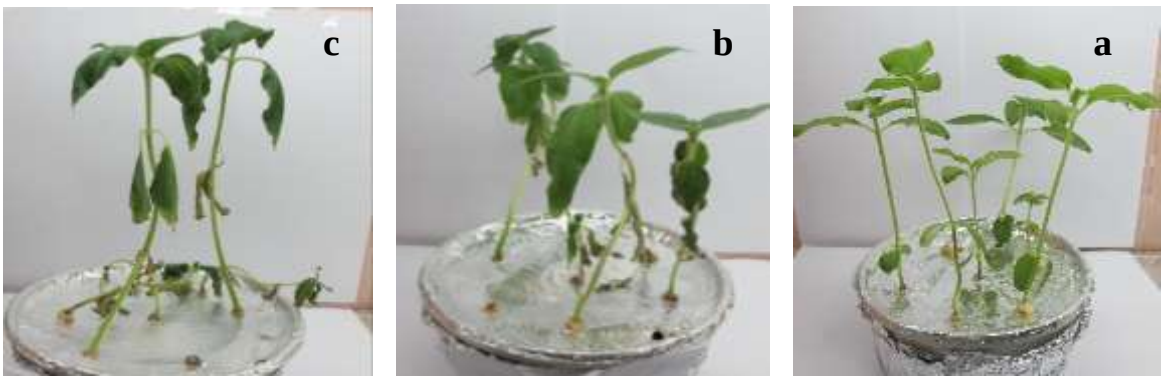
نتایج

تأثیر نفتالین بر رشد گیاه *H. annuus*: همان‌گونه که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، نتایج حاصل از مقایسه رشد اندام‌های هوایی در گیاه *H. annuus* بیانگر آن است که با افزایش غلظت نفتالین، رشد گیاه کاهش و از شادابی گیاه کاسته شده است. در گروه تحت تیمار با غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر نفتالین (شکل b ۱) نسبت به گروه شاهد (شکل a ۱)، نفتالین به‌عنوان عامل بازدارنده رشد در گیاه *H. annuus* شناخته شده است، ولی به‌علت غلظت پایین نفتالین با سرعت کمتری از رشد ممانعت کرده و این عامل موجب پژمردگی کمتر گیاهان این گروه نسبت به گروه تحت تیمار با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نفتالین (شکل c ۱) شده است. همچنین نتایج حاصل از مقایسه ریشه گروه کنترل با ریشه تیمارها، نشان می‌دهند که تنش نفتالین به ریشه و تارهای کشنده آسیب می‌رساند و باعث سیاه‌شدن ریشه می‌گردد (شکل۲). همچنین افزایش کرک‌های ساقه در اثر تیمار با نفتالین مشاهده شد (شکل ۳). با مطالعات ماکروسکوپی وجود سوختگی و لکه‌های سفید روی برگ‌ها نیز در گیاهان تیماردیده مخصوصاً تیمار ۵۰ مشخص بود (شکل ٤).

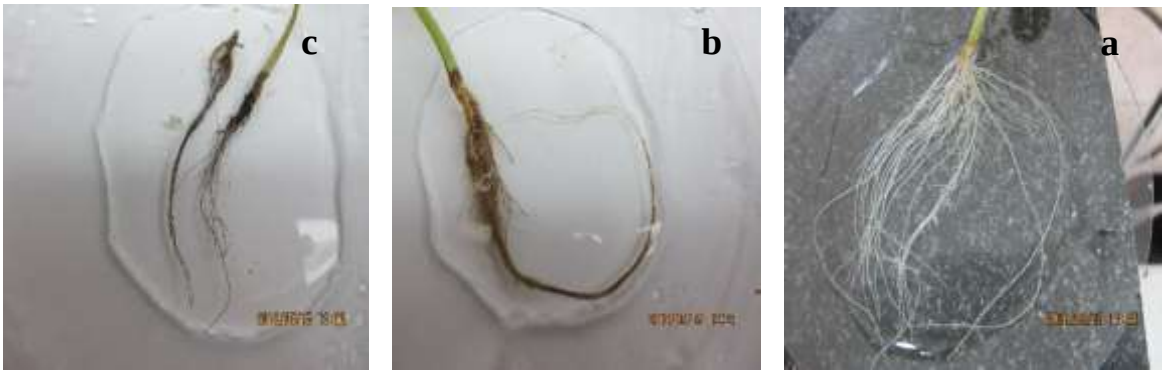
تأثیر نفتالین بر آناتومی ساقه گیاه *H. annuus*: با توجه

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.21.9]



شکل ۱- شکل ظاهری بخش هوایی گیاه، a: شاهد، b: تیمار ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر نفتالین، c: تیمار۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نفتالین



شکل ۲- شکل ظاهری ریشه گیاه آفتابگردان، a: شاهد، b: تیمار ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر نفتالین، c: تیمار۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نفتالین

شکل ۳- کرک‌های ساقه از راست به چپ به‌ترتیب: شاهد، تیمار ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر، تیمار ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نفتالین

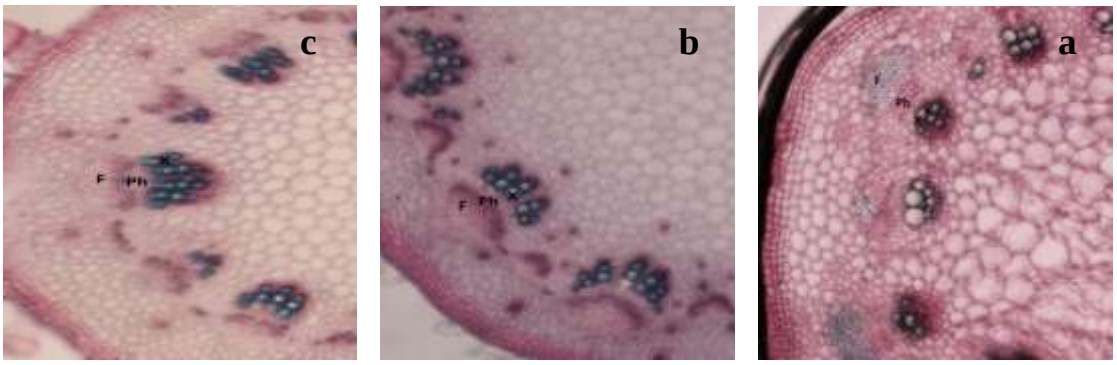
به برش‌های میکروسکوپی این طور به‌نظر می‌رسد که تیمار نفتالین با ایجاد حالت تنش باعث گسترش آوندهای چوبی (از نظر تعداد و طرز قرارگیری) از شاهد به تیمار ۳۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نفتالین شده است. همچنین با ایجاد حالت تنش، چوبی‌شدن آوندهای چوب تشدید یافته و طرز قرارگرفتن آوندهای چوبی به‌طور منظم‌تری نسبت به نمونه‌های شاهد گشته و این آوندها گسترش یافته‌اند (شکل ۵ a، b و c).

بررسی‌های بیوشیمیایی: نتایج حاصل از تجزیه واریانس اثر نفتالین بر فاکتورهای اندازه‌گیری‌شده در این تحقیق نشان داد تأثیر نفتالین بر فعالیت آنزیم APX و میزان MDA در ریشه معنی‌دار نیست، اما اثر تیمار بر فعالیت آنزیم PO در اندام هوایی و میزان پرولین در ریشه و اندام هوایی در سطح یک

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.21.9]

شکل ٤- شکل ظاهری برگ‌های گیاه. سوختگی و ظهور لکه‌های سفید روی برگ در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نفتالین



شکل ۵- برش عرضی ساقه گیاه آفتابگردان با بزرگنمایی 10X. a: شاهد، b: تیمار۳۰ گرم در لیتر نفتالین، c: تیمار ۵۰ گرم در لیتر نفتالین. Ph: فلوئم، X: آوند چوب،F: فیبر.

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر نفتالین بر برخی شاخص‌های فتوسنتزی و تنش اکسیداتیو در گیاه آفتابگردان

منابع تغییرات	df	SOD		PO		APX		MDA		Pro		Chl	
		اندام هوایی	ریشه	اندام هوایی	ریشه	اندام هوایی	ریشه	اندام هوایی	ریشه	اندام هوایی	ریشه	a	b
نفتالین	۲	*	**	**	*	*	ns	*	ns	**	**	*	*
اشتباه آزمایشی	٦	۰	۰	۰/۰۰۱	۰/۰۰۳	۰/۰۰۱	۰	۸/.۷	۳/۳٦۱	۰/۰۵۳	۰/۰۳۷	۰/۲۳	۰/۰۲۷
ضریب تغییرات ٪		۰/۳	۱/۲	٦/٦	۸/۸	٤/٦	۲/۲	۵/۲	۲/۳	۸/۲	۵/۳	۷/۹	۳/۲

ns، * و **: به‌ترتیب نشان‌دهنده عدم‌معنی‌داری و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد می‌باشند.

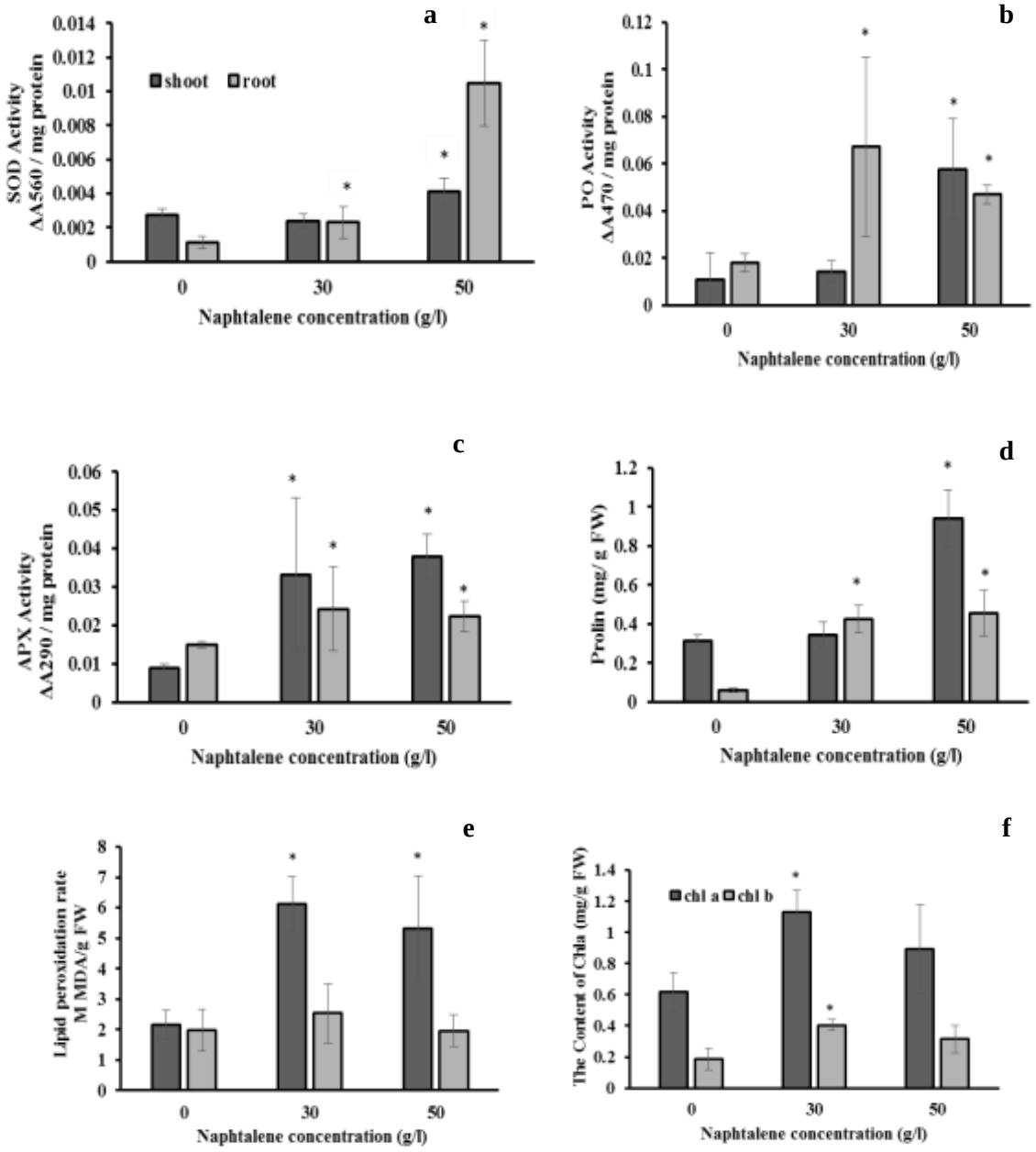
درصد معنی‌دار است و بقیه فاکتورها در سطح پنج درصد معنی‌دار هستند (جدول ۱).

فعالیت آنزیم SOD در اندام هوایی و ریشه: با توجه به نتایج حاصل از اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در گیاه *H. annuus*، تیمار نفتالین باعث افزایش فعالیت این آنزیم در ریشه و اندام هوایی شد؛ این افزایش در غلظت ۳۰ میلی‌گرم اندام هوایی معنی‌دار نبود. (شکل a ٦).

فعالیت آنزیم PO در اندام هوایی و ریشه: میزان فعالیت آنزیم محلول (PO) دراندام هوایی و ریشه درگروه‌های تحت تیمار با نفتالین نسبت به گیاهان شاهد افزایش یافته است که این افزایش در غلظت ۳۰ میلی‌گرم در اندام هوایی معنی‌دار نبود (شکل b ٦).

فعالیت آنزیم APX در اندام هوایی و ریشه: فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) در اندام هوایی گیاه

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.21.9]



شکل ٦- تأثیر غلظت‌های ۳۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نفتالین بر (a) SOD، (b) PO، (c) APX، (d) پرولین، (e) MDA و (f) Chl a, b نسبت به گروه کنترل، داده‌ها میانگین سه تکرار و میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف معیار می‌باشند. معنی‌داری در $P \leq 0.05$ در نظر گرفته شده است. معنی‌داری گروه‌ها نسبت به شاهد با علامت * نشان داده شده است.

H. annuus در تیمارهای ۳۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نفتالین نسبت به شاهد افزایش داشته است. این افزایش در سطح $P \leq 0.05$ نیز معنی‌دار بود. همانطور که مشاهده می‌گردد با توجه به نتایج به‌دست آمده آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) در ریشه گیاه *H. annuus* در غلظت‌های۳۰ و۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نفتالین نسبت به گروه شاهد افزایش یافت (شکل ٦ c).

میزان پرولین در اندام هوایی و ریشه: نتایج حاصل از سنجش پرولین دراندام هوایی و ریشه، بیانگر افزایش نسبی میزان پرولین در گیاهان تیماردیده نسبت به گیاهان شاهد

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.21.9]

می‌باشد. این افزایش در غلظت ۳۰ میلی‌گرم اندام هوایی معنی‌دار نبود (شکل d ٦).

میزان MDA در اندام هوایی و ریشه: نتایج حاصل از اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدهید (MDA) در اندام هوایی گیاه *H. annuus* نشان داد که تیمار نفتالین بر میزان مالون‌دی‌آلدهید اثر افزاینده داشته است، اما در ریشه گیاه *H. annuus* تیمار نفتالین بر میزان مالون‌دی‌آلدهید اثری نداشته است (شکل e ٦).

میزان کلروفیل a و b: مقادیر حاصل از سنجش محتوای کلروفیل a در گیاهان شاهد در مقایسه با گیاهان تیمارشده نشان‌دهنده افزایش کلروفیل a و b را در گیاهان تیماردیده بود این افزایش در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نفتالن معنی‌دار نبود. (شکل f ٦).

بحث

مطالعات اخیر نشان داده‌اند جذب مستقیم نفتالین در گیاهان، با مجموعه‌ای از پاسخ‌های ریختی و فیزیولوژیکی همراه است (Zhung *et al*., 2010). در تحقیق حاضر، این پاسخ‌ها با تمرکز بر پیامدهای ریخت‌شناسی، آنزیم‌های تنش اکسیداتیو، میزان کلروفیل و پرولین در گیاه آفتابگردان انجام شده است. تأثیر PAHs در آرابیدوپسیس تغییرات ریختی را نشان داده است، نظیر کاهش رشد ریشه و ساقه، تغییر شکل کرک‌ها، زیان‌رساندن به ریشه و تارکشنده، زردشدن و ظهور لکه‌های سفید برگی (Alkio *et al*., 2005). در گیاه آفتابگردان تحت تأثیر نفتالین نیز ریشه‌ها آسیب دیده، تغییر رنگ داده و تارهای کشنده از بین می‌رود. همچنین نفتالین با بر هم‌زدن تعدیل اسمزی در گیاه، تورگور و رشد برگ‌ها را تحت‌الشعاع قرار می‌دهد. بزرگ‌شدن سلول با تورژسانس مرتبط است که فاکتور مهمی در رشد برگ می‌باشد (Zayed and Zeid, 1997-1998). معمولاً تحت تنش، رشد کاهش می‌یابد ولی در مقابل سازش‌های متنوع ریختی و فیزیولوژیکی در گیاهان در جهت تحمل تنش شناخته شده‌اند. یکی از مکانیسم‌ها در جهت تعدیل اسمزی کاهش پتانسیل آبی برگ است (Banona *et al*., 2004) که پژمردگی برگ‌ها را به‌دنبال دارد. گزارش‌های زیادی نیز برای افزایش کرک‌ها در اثر تنش‌های محیطی مثل خشکی و شوری وجود دارد (Aguirre-Medina *et al*., 2002). افزایش کرک ممکن است یک مکانیسم در افزایش تحمل تنش نفتالین باشد، به‌طوریکه در تنش شوری نشان داده شده است وجود کرک‌ها می‌تواند در دفع مواد زائدی مثل یون‌ها، به بیرون مؤثر باشند (Gucci *et al*., 1997; Dolatabadian *et al*., 2011).

یکی دیگر از مکانیسم‌های دفاعی گیاه معمولاً تغییراتی در آوند چوبی می‌باشد. به‌طوریکه نشان داده شده است در اثر تنش خشکی در گیاه *Vitis vinifera*، سطح آوندهای چوبی ساقه کاهش یافته و در تنش با شدت کمتر، آمبولیسم و کاهش هدایت آب در ساقه مشاهده شده است که این امر با افزایش تنش تشدید می‌یابد (Anjum *et al*., 2011). براساس تحقیقات Fonti و همکاران (۲۰۰۹) نحوه قرارگیری آوندهای چوبی در اثر شرایط محیطی به‌طور قابل توجهی تحت تأثیر قرار می‌گیرد، همچنین تأثیر تنش خشکی بر قطر و تراکم آوند چوبی در گیاه *Quercus ilex* نشان داده شده است (Corcuera *et al*., 2004). تنش شوری در آوندهای چوبی ساقه تغییرات ساختاری ایجاد می‌کند، به‌طوریکه ضخامت سلول‌های آوند چوبی بیشتر می‌شود. معمولاً وقتی در اثر تنش و بر هم‌خوردن تعادل اسمزی توسعه سلول کاهش یابد، دیواره سلول چوبی می‌شود، به‌همین دلیل سلول‌های تحت تنش در زمان تمایز به بافت‌های تخصص‌یافته مثل آوند چوبی، زودتر چوبی می‌شوند (Christensen *et al*., 1998; Dolatabadian *et al*., 2011). در پاسخ به تیمار نفتالین میزان چوبی‌شدن آوندهای چوبی و قطر داخلی آنها در ساقه گیاهان تیماردیده افزایش یافته است؛ تشدید در نمو آوند چوب تحت تنش شوری نیز درساقه‌های سویا نشان داده شده است (Dolatabadian *et al*., 2011).

در شرایط تنش، تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) نظیر H_2O_2، OH^- و O_2^- در میتوکندری و کلروپلاست قطعی است. با افزایش این ترکیبات به‌عنوان پیامبر ثانویه مسیر علامت‌رسانی در گیاه ایجاد می‌شود. ROS به نوکلئوتیدها، پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و اسیدهای چرب حمله می‌کنند. گیاهان مکانیسم‌هایی را برای از بین‌بردن این ترکیبات به خدمت

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.21.9]

می‌گیرند مانند آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (PO) و آسکوربات پراکسیداز (APX) (Liu *et al*., 2009). PAHs نیز به‌عنوان عامل تنش، باعث تولید ROS و مرگ سلولی می‌شوند (Alkio *et al*., 2005; Flocco *et al*., 2005). به‌طوریکه درنتیجه ایجاد تنش اکسیداتیو در اثر فنانترن، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و شاخص پراکسیداسیون لیپیدی افزایش می‌یابد (Liu *et al*., 2009). همچنین گزارشات متعددی حاکی از متابولیزه‌شدن آلاینده‌های آلی نظیر بنزوتریازول (Castro *et al*., 2003) و تری نیترو تولوئن (Adamia *et al*., 2006)، در گیاه آفتابگردان وجود دارد که در این مسیر آنزیم‌های سیتوکروم P_{450} منواکسیژناز، پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، فنل اکسیدازها و غیره فعالیت دارند (Eapen *et al*., 2007).

مهم‌ترین و اولین آنزیم آنتی‌اکسیدان در تمام ارگانیسم‌های هوازی SOD می‌باشد (Cunningham *et al*., 1984; Ghanati *et al*., 2005). در این تحقیق میزان این آنزیم در اثر تیمار نفتالین افزایش یافت. SOD می‌تواند باعث تبدیل رادیکال سوپراکسید به هیدروژن پراکسید شود (Mccord and Fridovich, 1969)، سپس هیدروژن پراکسید می‌تواند توسط آنزیم آسکوربات پروکسیداز در سیکل آسکوربات – گلوتاتیون که در کلروپلاست عمل می‌کند یا توسط پراکسیداز در دیواره سلولی و سیتوپلاسم و یا توسط کاتالاز در پراکسیزوم و میتوکندری به آب و اکسیژن مولکولی تجزیه گردد (Mishra *et al*., 2006). افزایش دو آنزیم SOD و PO با تأثیر فنانترن و پیرن در گیاه برنج نشان داده شده است (Li *et al*., 2008). تنش‌های غیرزیستی دیگر نیز بر افزایش آنزیم SOD تأثیر گذارند: نظیر سرب (با غلظت‌های پایین) در گیاهان مختلف (Sharma and Dubey, 2005) و تیمار کادمیوم در گیاه گندم (Amirjani *et al*., 2012). به‌نظر می‌رسد که تولید و فعالیت بیشتر این آنزیم، مکانیسم دفاعی مهمی در برابر تنش است که به استراتژی گیاه و مقاومت گیاهی نسبت داده می‌شود، به‌طوریکه این آنزیم احتمالاً باعث هضم رادیکال سوپراکسید شده است.

آنزیم APX، هیدروژن پراکسید را در کلروپلاست، سیتوسول، میتوکندری و پراکسی‌زوم سلول‌های گیاهی به آب تبدیل می‌کند و پتانسیل هیدروژن لازم را از احیای آسکوربات می‌گیرد (Foyer and Noctor, 2005). آسکوربات پراکسیداز در واکنش آسکوربیک اسید با هیدروژن پراکسید و سوپراکسید به‌ترتیب سبب تشکیل اسید مونو دهیدرو آسکوربات و دهیدرو آسکوربات می‌شود که این ترکیبات توسط مونو دهیدرو آسکوربات ردوکتاز و دهیدرو آسکوربات ردوکتاز و احیا گلوتاتیون یا NAD(P)H، به آسکوربات تبدیل می‌شود.

افزایش معنی‌دار فعالیت APX در تیمار ۳۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نفتالین بیانگر این مطلب است که گیاه برای افزایش قدرت سازگاری خود تولید آنزیم APX را افزایش می‌دهد تا با کاهش میزان H_2O_2 قادر به سازگاری با شرایط تنش شود. در مطالعه‌ای که توسط Razavizadeh و Rostami در سال ۲۰۱۳ بر روی گیاه کلزا صورت گرفت، نشان داده شد که تنش شوری در حضور سالیسیلیک اسید باعث افزایش غلظت APX در ساقه و همچنین کاهش غلظت در ریشه می‌شود. قناتی و نعمتی نیز در سال ۱۳۸۹ افزایش APX را در ریشه گیاه لیسیانتوس تحت تیمار آلومینیوم گزارش کردند.

بخش محلول پراکسیداز (PO) که از گایاکول به‌عنوان دهنده الکترون استفاده می‌کند، درپاسخ‌های گیاه به شرایط تنش نقش دارد (Pandolfini *et al*., 1992). POها معمولاً واکنش اکسیداسیون و احیا را بین هیدروژن پراکسید به‌عنوان گیرنده الکترون و انواع زیادی از سوبستراها مثل ترکیبات فنلی، آسکوربیک اسید، آمین‌های آروماتیک و سیتوکروم C کاتالیز می‌کنند و به‌عنوان آنزیم‌های سم‌زدای گونه‌های اکسیژن واکنشگر عمل می‌کنند. آنزیم PO موجب شکسته‌شدن هیدروژن پراکسید در سلول می‌شود و بدین شکل از تولید ROSها جلوگیری می‌کند و بنابراین با بالارفتن سطوح فعالیت این آنزیم، گیاه کمتر مورد تهاجم ROS قرار می‌گیرد. این گروه از آنزیم‌ها در سیتوزول، واکوئل، کلروپلاست و آپولاست وجود دارند (Levitt, 2009). POها قادرند برخی از انواع PAH را اکسیده کرده و تغییر دهند. در نهایت این فاکتورها به

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.21.9]

واکوئل منتقل و متابولیزه می‌گردند. البته مسیر تجزیه این مواد زیاد مشخص نیست (Eapen *et al*., 2007). در تحقیقی Song و همکاران (۲۰۱۱)، تأثیر PAH (مخلوطی از پیرن و ترفنیل) را بر سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه *Kandelia candel* بررسی کرده و مشاهده نمودند میزان فعالیت آنزیم‌های SOD، PO و کاتالاز در ریشه و ساقه گیاه افزایش می‌یابد، این افزایش در ساقه معنی‌دارتر بود.

پژوهش‌های زیادی در مورد اثر تنش فلز سنگین بر فعالیت آنزیم پراکسیداز صورت گرفته است، Chaoui و Ferjani (۲۰۰۵) افزایش غلظت روی را در لوبیا بررسی کرده و مشاهده نمودند که فعالیت این آنزیم با افزایش سولفات روی در اندام هوایی افزایش می‌یابد. همچنین در پژوهش‌هایی در گیاه خردل هندی (Prasad and Strzalka, 2002) و جو(Erdei *et al*., 2002) تحت تیمار روی فعالیت آنزیم پراکسیداز در اندام هوایی به‌علت تولید H_2O_2 ناشی از تیمار روی افزایش، اما در ریشه حالت عکس داشته و با افزایش روی فعالیت آنزیم پراکسیداز در ریشه کاهش داشته است.

در تحقیق حاضر افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم PO در تیمار نفتالین با افزایش فعالیت SOD وAPX در جهت کاهش میزان H_2O_2 و سازگاری گیاه با تنش اکسیداتیو هماهنگ می‌باشد.

مدارک بسیاری نقش آمایش پرولین در تنظیم ریخت‌شناسی، تمایز یاخته‌ای و انتقال مراحل تکوینی حتی در غیاب تنش را تأیید می‌کنند (Hare *et al*., 2001). این فرضیه وجود دارد که با انباشتگی سیتوپلاسمی پرولین، پتانسیل آبی یاخته‌ای نسبت به پتانسیل آبی بیرونی کاهش می‌یابد. این امر موجب می‌شود تا آب به سمت یاخته حرکت کند و فشار تورژسانس یاخته که برای رشد آن ضروری است حفظ شود (Hare *et al*., 2001). همچنین میزان بالای آمایش پرولین، فعالیت مسیر اکسایش پنتوز فسفات را افزایش می‌دهد که افزایش این مسیر با بافت‌هایی با میزان تقسیم یاخته‌ای و تمایز بالا مانند بافت‌های مریستمی مرتبط است(Hare *et al*., 2001). افزایش پرولین نشانه‌ای برای تنش است. کمتر از ۵٪ ذخیره کل آمینواسیدهای آزاد گیاهان تحت شرایط مستقل از تنش از طریق پرولین تأمین می‌شود. در بسیاری از گیاهان تحت اشکال متنوع تنش، غلظت پرولین حداکثر به ۸۰٪ از ذخیره آمینواسیدی افزایش می‌یابد. پرولین در سیتوپلاسم گیاهان بیشتر از واکوئل ذخیره می‌شود. تنظیم اسمزی یاخته، پایداری پروتئین‌ها، رویش رادیکال‌های هیدروکسیل، تنظیم pH سلولی از نقش‌های مطرح‌شده در هنگام تنش است (Matysik *et al*., 2002). مشابه با تحقیق حاضر، Song و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند PAH علاوه بر تأثیر بر سیستم آنتی‌اکسیدان باعث بالارفتن پرولین در ریشه و ساقه گیاه *Kandelia candel* شده است. افزایش پرولین در برابر تنش‌های دیگر مانند تنش سرما در گیاه پنبه (Safari *et al*., 2012) و همچنین تنش خشکی در گل اطلسی (Yamada *et al*., 2005) نیز مشاهده شده است.

مالون‌دی‌آلدهید فراوان‌ترین محصول سمی سلولی ناشی از پروکسیداسیون چربی‌ها و نشان‌دهنده میزان تولید رادیکال‌های آزاد و بافت‌های تخریب شده است (Ohkawa *et al*., 1979; Davey *et al*., 2005). در گیاه *Kandelia candel* همراه با افزایش آلاینده‌های PAH، میزان MDA در ریشه و ساقه بالا می‌رود (Song *et al*., 2011). نفتالین در اندام هوایی گیاه باعث می‌شود تعادل رادیکال‌های آزاد و سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه *H. annuus* به‌هم بخورد و درنتیجه این تنش، پراکسیداسیون لیپیدها و میزان مالون‌دی‌آلدهید افزایش می‌یابد.

با توجه به اینکه آنزیم پراکسیداز نقش مهمی در حذف ROS بازی می‌کند، همچنین تجمع پرولین نیز می‌تواند اثرات تخریبی را از بین ببرد، احتمالاً پراکسیداز ناکافی باعث آسیب بیشتر به غشای لیپیدی و تولید MDA می‌گردد (Song *et al*., 2011). احتمالاً کمبود این آنزیم در غلظت ۳۰ میلی‌گرم نفتالین، به‌همراه افزایش بی‌معنی سوپراکسید دیسموتاز و اسیدآمینه پرولین باعث آسیب غشا در ساقه شده است. در واقع مکانیسم‌های دفاعی گیاهان برابر تنش‌های غیرزیستی ممکن است در اندام‌های مختلف (اندام هوایی و ریشه) متفاوت باشد (Li *et al*., 2008). بررسی اثر مس بر گیاه *Withania somnifera* توسط Khatun و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان داد

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.21.9]

اثرات غلظت زیاد مس موجب افزایش پراکسیداسیون لیپید می‌گردد، اما تحقیقات دولت‌آبادیان در سال ۱۳۸۷ کاهش MDA را در غلظت پایین شوری تحت تیمار سالیسیلیک اسید در *Triticum aestivum* نشان داد. قناتی و نعمتی نیز در سال ۱۳۸۹ گزارش دادند که تحت تأثیر عنصر آلومینیوم در ریشه گیاه لیسیانتوس، به‌دنبال افزایش کاتالاز و کاهش H_2O_2 و در نتیجه کاهش آسیب به غشای پلاسمایی، مالون‌دی‌آلدهید کاهش می‌یابد.

فتوسنتز یکی از حساس‌ترین فرآیندهای متابولیکی است و مطالعات متعددی بازدارندگی فتوسنتز درگیاهان مختلف رشدیافته تحت تنش فلزات سنگین را گزارش کرده‌اند. این تنش کاهش فتوسنتز را ممکن است از طریق بازگشایی روزنه، آسیب به سازماندهی فراساختاری کلروپلاست، تغییر در متابولیت‌های فتوسنتزی، جایگزینی یون‌هایی مانند منیزیم و منگنز و غیره با سرب در کلروپلاست و ممانعت از ساختن یا تجزیه رنگیزه‌های فتوسنتزی القاء کند (Reddy *et al.*, 2005). ارزیابی کلروفیل a به‌عنوان یک شاخص فیزیولوژیک در شرایط تنش به‌کار می‌رود. به‌طوریکه در تنش دما، خشکی، شوری و فلزات سنگین میزان کلروفیل a زیاد می‌شود (Kalaji *et al.*, 2016). احتمالاً از آنجا که نفتالین موجب خشکی فیزیولوژیک در گیاه آفتابگردان می‌گردد، درنتیجه افزایش کلروفیل را به‌دنبال دارد.

افزایش معنی‌دار محتوای کلروفیل a و b در غلظت پایین‌تر نفتالین، همچنین افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های سیستم آنتی‌اکسیدان و نیز ترکیبات آنتی‌اکسیدان سبب حمایت فرآیندهای متابولیسم در برابر اثرات سمی نفتالین در غلظت ۳۰ میلی‌گرم می‌شود. در تنش هیدروکربن فلورانتن در گیاه نخود نشان داده شده است به‌دلیل اختلال در جذب عناصری مثل نیتروژن و فسفر، سنتز کلروفیل مهار می‌شود (Kummerova *et al.*, 2006). با توجه به اینکه در گیاه آفتابگردان در غلظت ۵۰ نفتالین، میزان آسیب‌دیدگی ریشه و تارهای کشنده زیاد است، نقص در جذب عناصر منطقی به‌نظر می‌رسد. این مسأله می‌تواند سنتز کلروفیل را مختل کند. در گیاهان برنج تیمارشده با فنانترن و پیرن نیز افزایش کلروفیل در غلظت‌های پایین‌تر این تیمار مشاهده شد در حالیکه محتوای کلروفیل در غلظت بالای تیمار کاهش یافته است (Li *et al.*, 2008).

نتیجه‌گیری

تأثیر نفتالین در غلظت‌های ۳۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر در فاز رویشی گیاه آفتابگردان و پس از ١٤ روز تیمار، باعث آسیب‌دیدگی و کاهش رشد ریشه و از بین‌رفتن تارهای کشنده گردید. تغییر تعادل اسمزی به‌همراه اختلال در جذب عناصر در اثر نفتالین، پژمردگی بخش هوایی، کاهش رشد و کوچک‌شدن برگ‌ها را به‌همراه داشت. این امر با ایجاد لکه‌های سفید و نکروز در برگ توأم بود. در مکانیسم‌های دفاعی ریخت‌شناسی، میزان کرک‌های ساقه افزایش یافت. نفتالین در گیاه آفتابگردان استرس اکسیداتیو را القاء کرده و به‌دنبال آن افزایش فعالیت نسبی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان به‌همراه تسریع تکامل آوندهای چوبی تا حدودی در جهت مهار تنش اکسیداتیو عمل می‌کنند. افزایش در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، کلروپلاست و دستگاه فتوسنتزی را حمایت نموده و بالارفتن میزان تولید کلروفیل در تیمار غلظت ۳۰ میلی‌گرم در لیتر را به‌همراه دارد.

منابع

قناتی، ف. و نعمتی، ف. (۱۳۸۹) تأثیر مثبت آلومینیوم در فعال‌کردن سیستم آنتی‌اکسیدان ریشه‌های گیاه لیسیانتوس (*Eustoma grandiflora* L.). زیست‌شناسی گیاهی ایران ۲: ٤١-٥٣.

Aguirre-Medina, J. F., Acosta-Gallegos, J. A., delRuiz-Posadas, L., Shibata, J. K. and Trejo-Lopez, C. (2002) Morphological differences on the leaf epidermis of common bean and their relationship to drought tolerance. Agricultura Technical en Mexico 28: 53-64.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.21.9]

Adamia, G., Ghoghoberidze, M., Graves, D., Khatisashvili, G., Kvesitadze, G., Lomidze, E., Ugrekhelidze, D. and Zaalishvili, G. (2006) Absorption distribution and transformation of TNT in higher plants. Ecotoxicology and Environmental Safety 64: 136-45.

Alkio, M., Tabuchi, T. M., Wang, X. and Carmona, A. (2005) Stress responses to polycyclic aromatic hydrocarbons in Arabidopsis include growth inhibition and hypersensitive response-like symptoms. Journal of Experimental Botany 421: 2983-2994.

Amirjani, M. R. (2012) Effects of cadmium on wheat growth and some physiological factors. International Journal of Forest, Soil and Erosion 2: 50-58.

Anjum, Sh., Xie, X., Wang, L., Saleem, M., Chen, M. and Wang, L. (2011) Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. African Journal of Agricultural Research 6: 2026-2032.

Aprill, W. and Sims, R. (1990) Evaluation of the use of prairie grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbon treatment in soil. Chemosphere 20: 253-265.

Banona, S., Fernandez, J. A., Franco, J. A, Torrecillas, A. Alarcon, J. J. and Sanchez-Blanco, M. J. (2004) Effects of water stress and night temperature preconditioning on water relations and morphological and anatomical changes of *Lotus creticus* plants. Scientia Horticulturae 101: 333-342.

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

Belz, R. G., Cedergreen, N. and Soensen, H. (2008) Hormesis in mixtures–can it be predicted? Science of the Total Environment 404: 77-87.

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

Calabrese, E. J. and Blain, R. B. (2009) Hormesis and plant biology. Environmental Pollution 157: 42-48.

Cakmak, I. and Horst, W. J. (1991) Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). Physiologiae Plantarum 83: 463-468.

Castro, S., Davis, L. C. and Erickson, L. E. (2003) Phytotransformation of benzotriazoles. International Journal of Phytoremediation 5: 245-65.

Chaoui, A. and Ferjani, E. (2005) Effect of cadmium and copper on antioxidant capacities, lignification and auxin degradation in leaves of pea (*Pisum sativam* L.) seedling. Comptes Rendus Biologies 328: 23-31.

Christensen, J. H., Bauw, G., Welinder, K. G., Van Montagu, M. and Boerjan, W. (1998) Purification and characterization of peroxidases correlated with lignification in poplar xylem. Plant Physiology 118: 125-135.

Corcuera, L., Camarero, J. J. and Gil-Pelegrin, E. (2004) Effects of a severe drought on *Quercus ilex* radial growth and xylem anatomy. Trees 18: 83-92.

Cunningham, M. L., Ringrose, P. S. and Lokesh, B. R. (1984) Inhibition of the genotoxicity of bleomycin by superoxide dismutase. Mutation Research 135: 199-202.

Davey, M. W., Stals, E., Panis, B., Keulemans, J. and Swennen, R. L. (2005) High throughput determination of malondialdehyde in plant tissues. Analytical Biochemistry 347: 201-207.

De Vos, C. H. R., Schat, H., De Waal, M. A. D., Vooijs, R., and Ernst, W. H. O. (1991) Increased resistance to copper-induced damage of root plasma membrane in copper tolerant *Silene cucubalus*. Physiologiae Plantarum 82: 523-528.

Dolatabadian, A., Modarres-Sanavy, S. and Ganati, F. (2011) Effect of salinity on growth, xylem structure and anatomical characteristics of Soybean. Notulae Scientia Biologicae 3: 41-45

Dushenkov, S., Kapulnik, Y., Blaylock, M., Sorochisky, B., Raskin, I. and Ensley, B. (1997a) Phytoremediation: A novel approach to an old problem. In: Global Environmental Biotechnology (ed. Wise, D. L.) Pp. 563-572. Elsevier Science B.V., Amsterdam.

Dushenkov, S., Vasudev, D., Kapulnik, Y., Gleba, D., Fleisher, D., Ting, K. C. and Ensley, B. (1997b) Removal of uranium from water using terrestrial plants. Environmental Science and Technology 31: 3468-3474.

Eapen, S., Singh, S. and D'Souza, S. F. (2007) Advances in development of transgenic plants for remediation of xenobiotic pollutants. Biotechnology Advances 25: 442-451.

Erdei, S., Hegedus, A., Hauptmann, G., Szalai, J. and Horvath, G. (2002) Heavy metal induced physiological changes in the antioxidative response system. Acta Biologica Szegediensis 46: 89-90.

Flocco, C., Lobalbo, A., Carranza, M., Bassi, M., Giu-lietti, A. and Cormack, W. M. (2005) Some physiological, microbial, and toxicological aspects of the removal of phenanthrene by hydroponic cultures of Alfalfa (*Medicago sativa* L.). International Journal of Phytoremediation 4: 169-186.

Fonti, P., Von Arx, G., Gonzalez, I., Eilmann, B., Klaassen, U., Gartner, H. and Eckstein, D. (2009) Studying global change through investigation of the plastic responses of xylem anatomy in tree rings. New Phytologist 185: 42-53.

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.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.21.9]

Gallego, S. M., Benavides, M. P. and Tomaro, M. L. (1996) Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. Plant Science 121: 151-159.

Ghanati, F., Morita, A. and Yokota, H. (2005) Effects of aluminum on the growth of tea plant and activation of antioxidant system. Plant and Soil 276: 133-141.

Hare, P. D., Cress, W. A. and Staden, J. (2001) The effects of exogenous proline and proline analogues on in vitro shoot organogenesis in Arabidopsis. Plant Growth Regulation 34: 203-207.

Gucci, R., Aronne, G., Lombardini, L. and Tattini, M. (1997) Salinity tolerance in Phillyrea species. New Phytologist 135: 227-234.

Heidari, H. (2013) Effect of irrigation with contaminated water by cloth detergent on seed germination traits and early growth of Sunflower (*Helianthus annuus* L.). Notulae Scientia Biologicae 5: 86-89.

Hoagland, D. R. (1950) The water-culture method for growing plants without soil. College of Agriculture, University of California in Berkeley, Calif.

Horwitz, W., Chichilo, P. and Reynolds, H. (1970) Official methods of analysis of the association of official analytical chemists. Washington, DC, USA.

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. (2002) IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon, France.

Kalaji, H. M., Jajoo, A., Oukarroum, A., Brestic, M., Zivcak, M., Samborska, I. A., Cetner, M. D., Lukasik, I., Goltsev, V. and Ladle, R. J. (2016) Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. Acta Physiologiae Plantarum 38: 9-11.

Jimenez, A., Hernandez, J. A., del Rio, L. A. and Sevilla, F. (1997) Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of Pea leaves. Plant Physiology 114: 275-284.

Kjalke, M., Anderson, M. B., Schneider, P., Christensen, B., Schulein, M. and Welinder, K. G. (1992) Comparison of structure and activities of peroxidase from *Coprinus cinereus*, *Coprinus macrorhizus* and *Roystonena regia*. Biochimica et Biophysics Acta 1120: 248-256.

Khatun, S., Babarali, M., Hahn, E. and Paek, K. (2008) Copper toxicity in *Withania somnifera*: Growth and antioxidant enzymes responses of *in vitro* grown plants. Environmental and Experimental Botany 64: 279-285.

Levitt, J. (2009) Responses of plants to environmental stresses, water, radiation, salt, and other stresses. 2nd Ed Academic Press.

Kummerova, M., Krulova, J., Zezulka, S. and Triska, J. (2006) Evaluation of fluoranthene phytotoxicity in Pea plants by hill reaction and chlorophyll fluorescence. Chemosphere 65: 489-496.

Li, J. H., Gao, Y., Wu, S. C. K., Cheung, K. C., Wong, 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.

Lin, D., Zhu, L., He, W. and Tu, Y. (2006) Tea plant uptake and translocation of polycyclic aromatic hydrocarbons from water and around air. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54: 3658-3662.

Liste, H. H. and Alexander, M. (2000) Plant-promoted pyrene degradation in soil. Chemosphere 40: 7-10.

Liu, h., Weiman, D., Ye, Y., Cui, B., Haung, Y., Colon-Carmona, A. and Wang, Z. (2009) An oxidative stress response to polycyclic aromatic hydrocarbon exposure is rapid and complex in *Arabidopsis thaliana*. Plant science 176: 375-382.

Ma, B., He, Y., Chen, H., Xu, J. and Rengel, Z. (2010) Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the rhizosphere: synthesis through meta-analysis. Environmental Pollution 158: 855-861.

Maillacheruvu, K. and Safaai, S. (2002) Naphthalene removal from aqueous systems by *Sagittarius* sp. Journal of Environmental Science and Health 37: 845-861.

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

Mccord, J. M. and Fridovich, I. (1969) Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocuprein. Journal of Biological chemistry 244: 6049-6055.

Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R., Govindarajan, R., Kuriakose, S. and Prasad, M. (2006) Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. Plant Physiology and Biochemistry 44: 25-37.

Nakano, Y. and Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in Spinach chloroplasts. Plant and Cell Physiology 22: 867-880.

Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Analytical Biochemistry 95: 351-358.

Paskova, V., Hilscherova, K., Feldmannova, M. and Blaha, L. (2006) Toxic effects and oxidative stress in higher plants exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons and their N-heterocyclic derivatives. Environmental Toxicology and Chemistry 25: 3238-3245.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.21.9]

Pandolfini, F., Gabbrielli, R. and Comparini, C. (1992) Nickel toxicity and peroxidase activity in seedlings of *Triticum aestivum* L. Plant, Cell and Environment 15: 719-725.

Prasad, M. and Strzalka, K. (2002) Physiology and biochemistry of metal toxicity and tolerance in plants: Springer, Washington, DC, USA.

Prasad, M. N. V. (2007) Sunflower (*Helinathus annuus* L.) a potential crop for environmental industry. Helia 30: 167-174.

Razavizadeh, R. and Rostami, F. (2013) Changes in growth and antioxidant capacity of Canola by salinity and salicylic acid under *in vitro*. International Research Journal of Applied and Basic Sciences 4: 4093-4101.

Rahimizadeh, M., Habibi, D., Madani, H., Mohammadi, G. N., Mehraban, A. and Sabet, A. M. (2007) The effect of micronutrients on antioxidant enzymes metabolism in sunflower (*Helianthus annus* L.) under drought stress. Helia 30: 167-174.

Reddy, A. M., Kumar, S. G., Jyothsnakumari, G., Thimmanaik, S. and Sudhakar, C. (2005) Lead induced changes in antioxidant metabolism of Horse Gram (*Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc. and Bengalgram (*Cicer arietinum* L.). Chemosphere 60: 97-104.

Rentz, J. A., Chapman, B., Alvarez, P. J. and Schnoor, J. L. (2003) Stimulation of hybrid poplar growth in petroleum-contaminated soils through oxygen addition and soil nutrient amendments. International Journal of Phytoremediation 5: 57-72.

Safari, M., Ghanati, F., Behmanesh, M., Hajnorouzi, A., Nahidian, B. and Ghahremani, M. (2012) Enhancement of antioxidant enzymes activity and expression of CAT and PAL genes in Hazel (*Corylus avellana* L.) cells in response to low-intensity ultrasound. Acta Physiologiae Plantarum 35: 2847-2855.

Song, H., Wang, Y., Sun, C., Wu, M., Peng, Y., Deng, C. and Li, Q. P. (2011) Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons exposure on antioxidant system activities and proline content in *Kandelia candel*. Oceanological and Hydrobiological Studies 40: 9-18.

Srogi, K. (2007) Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. Environmental Chemistry Letters 5: 169-195.

Sharma, P. and Dubey, R. S. (2005) Lead toxicity in plants. Brazilian Journal of Plant Physiology 17: 35-52.

Yamada, M., Morishita, H., Urano, K., Shiozaki, N., Yamaguchi, K., Shinozaki, K. and Yoshiba, Y. (2005) Effects of free proline accumulation in petunias under drought stress. Journal of Experimental Botany 56: 1975-1981.

Zayed, M. A. and Zeid, I. M. (1997-1998) Effect of water and salt stresses on growth, chlorophyll, mineral ions and organic solutes contents, and enzymes activity in mung bean seedlings. Biologia Plantarum 40: 351-356.

Zhang, Zh., Rengel, Z. and Meney, K. (2010) Polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) differentially influence growth of various emergent wetland species. Journal of Hazardous Materials 182: 689-695.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.21.9]

Naphthalene effect on some morphological and physiological features in *Helianthus annuus* L.

Banafsheh Memarian, Maryam Khoshsokhan-Mozaffar*

Department of Biology, Qom branch, Islamic azad university, Qom, Iran
(Received: 10/02/2018, Accepted: 26/08/2018)

Abstract

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) are among the most stressful factors which that inhibit plant growth and distrupt balance between the production of Reactive Oxygen Species and antioxidant defense activities of plant. Naphthalene is the main pollutant in the petrochemical industry, which is located on the list of toxic pollutants. In this study to evaluate the effect of Naphthalene on some parameters of oxidative stress and anatomical features in *Helianthus annuus* L., an experiment was conducted in a randomized design with three replications in hydroponic culture. Seedlings that grew in normal conditions were transferred to a hydroponic culture, after 14 days of treatment with naphthalene (30, 50 mg/L) they were harvested and their anatomical and biochemical parameters were studied. The results showed that the activity of antioxidant enzymes (SOD, PO, APX) and the contents of malondialdehyde (MDA) and chlorophyll a and b increased. Due to naphthalene treatment, reduction of root growth, white spots and necrosis in leaves were observed. Number of stem trichromes was elevated and stem xylem expanded, and in addition there were changes in xylem formation and arrangement in stressed plants.

Keywords: *Helianthus annuus* L., Hydroponic culture, Naphthalene, Oxidative stress.

Corresponding author, Email: m.khoshm@gmail.com

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.21.9]