

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 ۱۴ 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 بین رفتن 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

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.,

به‌دلیل شهرنشینی و صنعتی‌شدن، هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای (PAHs) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons به‌طور فزاینده‌ای باعث آلودگی در اکوسیستم شده‌اند (Srogi, 2007). PAHs را می‌توان در دود حاصل از آگروز، 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

(2005). بطورکلی تنش‌های محیطی گوناگون و محرک‌های داخلی سبب اختلال در رد اکس 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 گلووتاتیون 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 گلووتاتیون ترنسفراز و همچنین میزان شاخص مالون‌دی‌آلدئید 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 ۸۰/۲۶ 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 تارکشدنه، 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.,

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 (۲۰۰۶)، جابه‌جایی PAHs مانند فنانترین و پیرن، توسط جریان آپوپلاستی از طریق دیواره‌های سلولی انجام می‌شود و تنها حجم کوچکی از ترکیب، در واکنش‌های سلولی با جابه‌جایی 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 (Rantz 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 در سال 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.,

Ca(NO₃)₂. 4H₂O: 2.5; KNO₃: 2.5; MgSO₄. 7H₂O: 1; KH₂PO₄: 0.5

(مقادیر بر حسب ppm):

Fe-EDTA: 3; H₃BO₃: 0.5; Mn (MnCl₂): 0.5; Zn (ZnCl₂): 0.05

Cu (CuCl₂. 2H₂O): 0.02; Mo (Na₂MoO₄): 0.02

پس از ۱۴ روز تیمار، ریشه گیاهان برداشت شده جهت حذف آلودگی سطحی نفتالین، با آب مقطر 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 فیزیولوژیک 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 تثبیت شده در F.A.A، در قسمت ساقه برش دستی تهیه شد. در برش‌گیری سعی شد که از قسمت‌های همسان ساقه برش گرفته شود. برش‌های تهیه شده به روش رنگ‌آمیزی مضاعف، رنگ‌آمیزی 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 میلی‌لیتر تهیه 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

(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 آفتابگردان 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 ۲۷±۳ 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 تغییر یافته هوکلند (۱/۲) دارای عناصر پرمصرف و کم‌مصرف به شرح زیر (pH=۶) می‌باشد (Hoagland, 1950):

(مقادیر بر حسب میلی‌مول):

(pH=۶) حاوی EDTA ۰/۱ میلی مول، آسکوربیک اسید ۵۰۰ میکرولیتر، H_2O_2 ۵۰۰ میکرولیتر و عصاره آنزیمی به میزان ۴۰۰ میکرولیتر تهیه و اکسیداسیون آسکوربات در طول موج ۲۹۰ نانومتر به مدت یک دقیقه سنجیده شد (Nakano and Asada, 1981) و فعالیت آنزیم براساس تغییرات جذب در میلی گرم پروتئین بیان شد.

سنجش آنزیم پراکسیداز محلول (SPO): از نمونه‌های منجمد شده به میزان ۲۰۰ میلی گرم وزن تر از اندام هوایی و ریشه به طور جداگانه، در ۳ میلی لیتر بافر $KH_2PO_4-K_2HPO_4$ (pH=۶/۱) حاوی ۰/۱ میلی مول EDTA ساییده و سپس با دور ۱۲۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد (تمام مراحل فوق در ۴ درجه سانتی گراد انجام شد). بخش روشناور حاصل برای سنجش آنزیم پراکسیداز محلول استفاده شد. به منظور سنجش فعالیت پراکسیداز ۳ میلی لیتر مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۱۹۵۰ میکرولیتر (pH=۶/۱)، ۵۰۰ میکرولیتر گایاکول و ۵۰۰ میکرولیتر هیدروژن پراکسید (H_2O_2) تهیه شد و سپس با افزودن به ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی دانسیته نوری آن در ۴۷۰ نانومتر به مدت یک دقیقه اندازه گیری شد. فعالیت آنزیم بر حسب تغییرات جذب به نسبت mg پروتئین عصاره بیان گردید (Kjalke et al., 1992).

سنجش میزان غلظت مالون دی آلدیید: سنجش میزان غلظت مالون دی آلدیید براساس روش (De Vos et al., 1991) سنجیده شد. مالون دی آلدیید با تیوباربیتوریک اسید (TBA) تشکیل کمپلکس رنگی می دهد که غلظت آن با دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه گیری می شود. نمونه های منجمد شده ۲۰۰ میلی گرم از ریشه نمونه های گیاهی در ۳ میلی لیتر محلول ۱۰ درصد (حجم/وزن) تری کلرو استیک اسید ساییده شد. سپس نمونه ها در ۳۰۰۰ دور به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. به ۱ میلی لیتر از بخش روشناور حاصل، ۱ میلی لیتر تیوباربیتوریک اسید ۰/۵ درصد افزوده شد. مخلوط حاصل در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت و بلافاصله در یخ سرد شده و دوباره سانتریفیوژ گردید. دانسیته نوری نمونه ها در طول موج ۵۳۲ نانومتر و ۶۰۰ نانومتر تعیین

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

سنجش آنزیم های سیستم آنتی اکسیدان، سنجش آنزیم سوپراکسید دسموتاز (SOD): از نمونه های منجمد شده به میزان ۲۰۰ میلی گرم وزن تر از اندام هوایی و ریشه به طور جداگانه، در ۳ میلی لیتر بافر $KH_2PO_4-K_2HPO_4$ (pH=۶/۱) حاوی ۰/۱ میلی مول EDTA ساییده و سپس با دور ۱۲۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد (تمام مراحل فوق در ۴ درجه سانتی گراد انجام شد). بخش روشناور حاصل برای سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز (SOD) با روش فوتوشیمیایی استفاده شد (Cakmak, 1991).

۳ میلی لیتر مخلوط واکنش حاوی: ۱/۵ سی سی بافر $KH_2PO_4-K_2HPO_4$ (pH=۶/۱) حاوی ۰/۱ میلی مول EDTA، ۳۰۰ میلی مول Na_2CO_3 ، ۳۰۰ میلی مول L-methionin، ۳۰۰ میلی مول Nitro Blue Tetrazoliumchloride (NBT)، ۳۰۰ میلی مول ریوفلاوین (riboflavin) و ۳۰۰ میلی مول عصاره آنزیمی تهیه شد و لوله ها به مدت ۱۰ دقیقه در معرض نور قرار گرفتند. سپس دانسیته نوری آن در ۵۶۰ نانومتر اندازه گیری شد. یک واحد فعالیت SOD براساس مقدار آنزیم مورد نیاز برای مهار ۵۰ درصد سرعت احیا NBT محاسبه و براساس تغییرات جذب در میلی گرم پروتئین بیان شد.

سنجش آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX): از نمونه های منجمد شده به میزان ۲۰۰ میلی گرم وزن تر از اندام هوایی و ریشه به طور جداگانه، در ۳ میلی لیتر بافر $KH_2PO_4-K_2HPO_4$ (pH=۶/۱) حاوی ۰/۱ میلی مول EDTA ساییده و سپس با دور $12000 \times g$ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد (تمام مراحل فوق در ۴ درجه سانتی گراد انجام شد). بخش روشناور حاصل برای سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) مورد استفاده قرار گرفت. ۳ میلی لیتر مخلوط واکنش حاوی: ۱۶۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم

این زمان بلافاصله آنها در حمام یخ سرد شدند. پس از رسیدن به دمای محیط به هر لوله ۴ 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 به صورت میکروگرم بر گرم وزن خشک $\mu\text{g g}^{-1}(\text{d.w.})$ محاسبه گردید (Bate et al., 1973).

آنالیزهای آماری: کلیه آنالیزها با سه تکرار مستقل انجام گرفت و سپس نتایج به دست آمده 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 معنی‌دار بودن 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) 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) 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 (شکل ۲). 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 تیمار دیده مخصوصاً تیمار ۵۰ مشخص بود (شکل ۴).

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

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

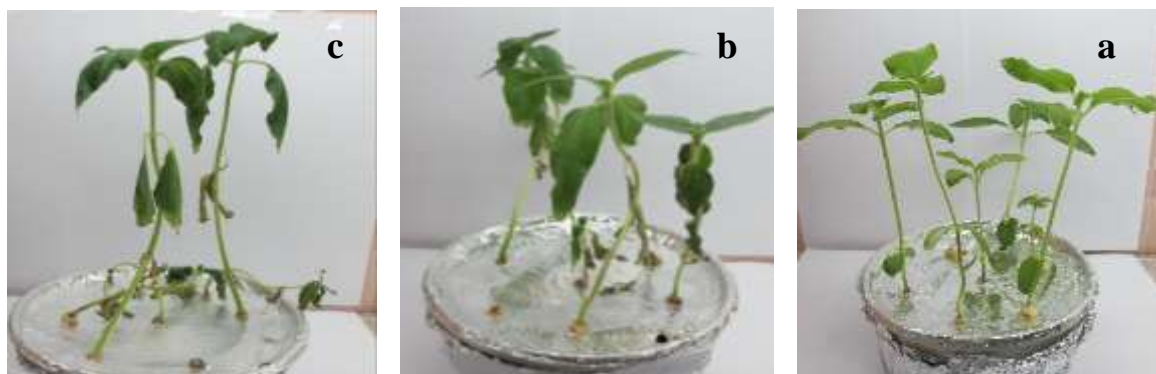
سنجش میزان کلروفیل: ۲۰۰ میلی‌گرم از نمونه‌ها با ۳ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد به‌طور کامل ساییده شد. عصاره حاصل با قیف حاوی کاغذ صافی در بالن ژوژه ۲۵ میلی‌لیتری صاف شد. به‌منظور جمع‌آوری کامل کلروفیل نمونه، کاغذ صافی با استون ۸۰ درصد چندین بار شستشو داده شد و سپس محتوای بالن با استون به حجم ۲۵ میلی‌لیتر رسانده شد. دانسیته نوری عصاره کلروفیل در طول‌موج‌های ۶۶۳ و ۶۴۵ نانومتر خوانده شد (Horwitz et al., 1970). مقدار کلروفیل a و b نمونه‌ها مطابق معادله‌های زیر محاسبه گردید.

$$a \text{ کلروفیل} = [12/7(D663) - 2/69(D645)]V/1000 \text{ W/g FW}$$

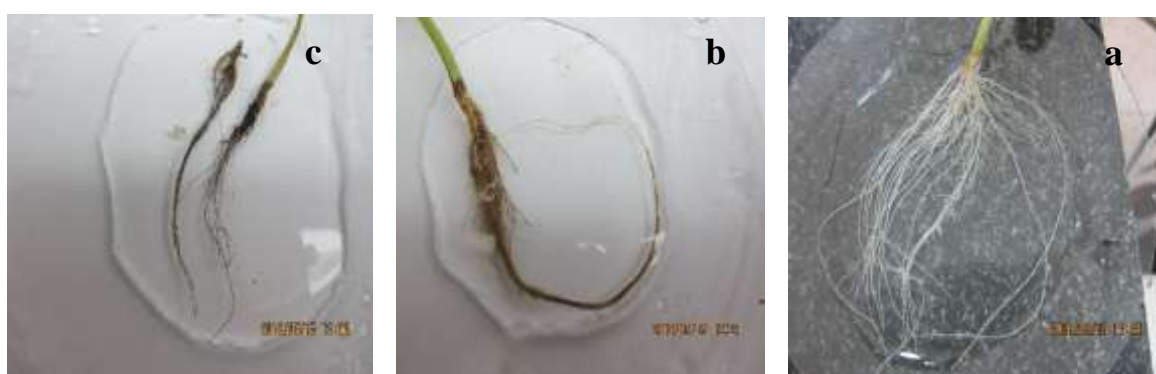
$$b \text{ کلروفیل} = [22/9(D645) - 4/68(D663)]V/1000 \text{ W/g FW}$$

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 استاندارد در محدوده بین صفر تا ۱۶/۱ (صفر، ۲/۳، ۴/۶، ۱۶/۱) 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



شکل ۱- شکل ظاهری بخش هوایی گیاه، a: شاهد، b: تیمار ۳۰ میلی گرم بر لیتر نفتالین، c: تیمار ۵۰ میلی گرم بر لیتر نفتالین



شکل ۲- شکل ظاهری ریشه گیاه آفتابگردان، a: شاهد، b: تیمار ۳۰ میلی گرم بر لیتر نفتالین، c: تیمار ۵۰ میلی گرم بر لیتر نفتالین



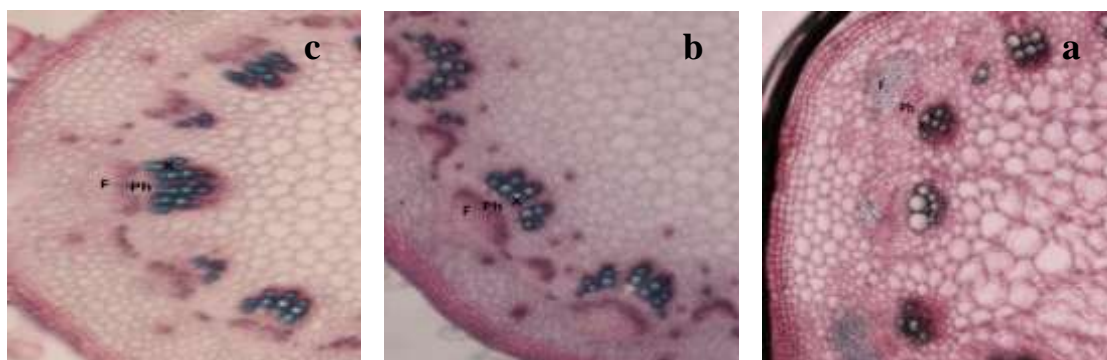
شکل ۳- کرک‌های ساقه از راست به چپ به ترتیب: شاهد، تیمار ۳۰ میلی گرم بر لیتر، تیمار ۵۰ میلی گرم بر لیتر نفتالین

شاهد گشته و این آوندها گسترش یافته‌اند (شکل a, b و c ۵).
 بررسی‌های بیوشیمیایی: نتایج حاصل از تجزیه واریانس اثر نفتالین بر فاکتورهای اندازه‌گیری شده 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

به برش‌های میکروسکوپی این طور به نظر 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 میلی گرم بر لیتر نفتالین شده است. همچنین با ایجاد حالت تنش، چوبی شدن آوندهای چوب تشدید یافته و طرز قرارگرفتن آوندهای چوبی به‌طور منظم‌تری نسبت به نمونه‌های



شکل ۴- 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: تیمار ۳۰ 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	
		ریشه	اندام هوایی	ریشه	اندام هوایی	ریشه	اندام هوایی	ریشه	اندام هوایی	ریشه	اندام هوایی	a	b
نفتالین	۲	**	*	**	*	*	*	ns	*	ns	**	**	*
اشتباه آزمایشی	۶	۰	۰	۰/۰۰۱	۰/۰۰۳	۰/۰۰۱	۰	۸/۷	۳/۳۶۱	۰/۰۵۳	۰/۰۳۷	۰/۲۳	۰/۰۲۷
ضریب تغییرات %		۰/۳	۱/۲	۶/۶	۸/۸	۴/۶	۲/۲	۵/۲	۲/۳	۸/۲	۵/۳	۷/۹	۳/۲

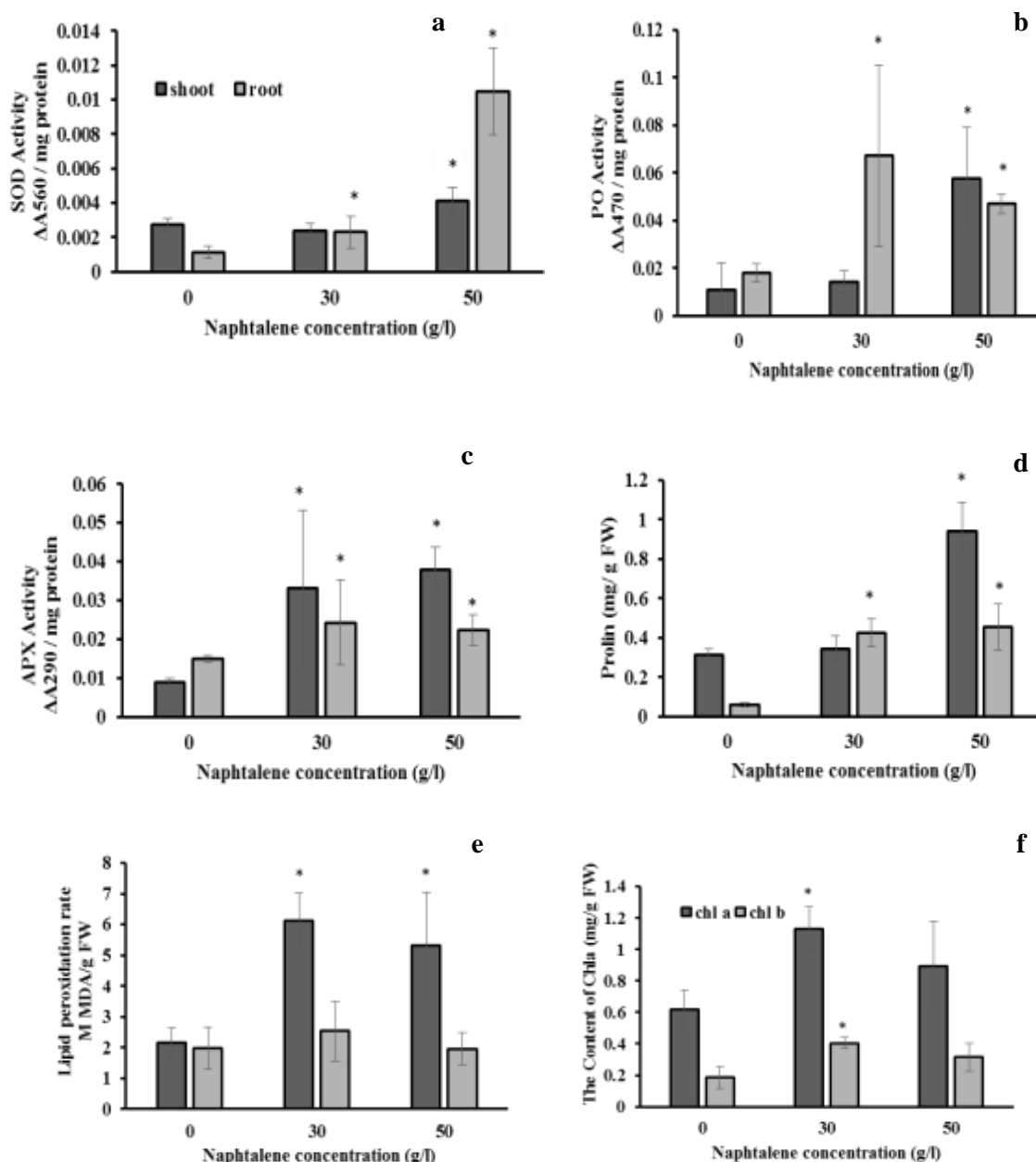
ns، * و ** به ترتیب نشان‌دهنده عدم معنی‌داری و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد می‌باشند.

فعالیت آنزیم PO در اندام هوایی و ریشه: میزان فعالیت آنزیم محلول (PO) در اندام هوایی و ریشه در گروه‌های 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 ۶).

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

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 ۶).



شکل ۶- تأثیر غلظت‌های ۳۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نفتالین بر SOD (a)، PO (b)، APX (c)، پرولین (d)، MDA (e) و Chl a, b (f) 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.

میلی‌گرم بر لیتر نفتالین نسبت به گروه شاهد افزایش یافت (شکل ۶c).

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

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 غلظت‌های ۳۰ و ۵۰

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 برهم خوردن 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 چوبی شدن آوندهای چوبی و قطر داخلی آنها در ساقه گیاهان تیماردیده افزایش یافته است؛ تشدید در نمو آوند چوب تحت تنش شوری نیز در ساقه‌های 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 بین بردن این ترکیبات به خدمت

می‌باشد. این افزایش در غلظت ۳۰ میلی‌گرم اندام هوایی معنی‌دار نبود (شکل ۶d).

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 افزایش‌دهنده داشته است، اما در ریشه گیاه *H. annuus* تیمار نفتالین بر میزان مالون‌دی‌آلدهید اثری نداشته است (شکل ۶e).
میزان کلروفیل a و b: مقادیر حاصل از سنجش محتوای کلروفیل a در گیاهان شاهد در مقایسه با گیاهان تیمار شده نشان‌دهنده افزایش کلروفیل a و b را در گیاهان تیماردیده بود. این افزایش در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نفتالین معنی‌دار نبود. (شکل ۶f).

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 آراییدوپسیس تغییرات ریختی را نشان داده است، نظیر کاهش رشد ریشه و ساقه، تغییر شکل کرک‌ها، زیان‌رساندن به ریشه و تارکشنده، زرد شدن 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 برهم‌زدن تعادل اسمزی در گیاه، تورگور و رشد برگ‌ها را تحت‌الشعاع قرار می‌دهد. بزرگ شدن 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

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 به ترتیب سبب تشکیل اسید مونو دهیدرو آسکوربات و دهیدرو آسکوربات می‌شود که این ترکیبات توسط مونو دهیدرو آسکوربات ردوکتاز و دهیدرو آسکوربات ردوکتاز و احیا گلوکاتیون 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. فناتی و نعمتی نیز در سال ۱۳۸۹ افزایش APX را در ریشه گیاه لیسیانوس تحت تیمار آلومینیوم گزارش کردند.

بخش محلول پراکسیداز (PO) که از گایاکول به‌عنوان دهنده الکترون استفاده می‌کند، در پاسخ‌های 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 شکسته شدن هیدروژن پراکسید در سلول می‌شود و بدین شکل از تولید ROSها جلوگیری می‌کند و بنابراین با بالا رفتن سطوح فعالیت این آنزیم، گیاه کمتر مورد تهاجم ROS قرار می‌گیرد. این گروه از آنزیم‌ها در سیتوزول، واکوئل، کلروپلاست و آپوپلاست وجود دارند (Levitt, 2009). POها قادرند برخی از انواع PAH را اکسیده کرده و تغییر دهند. در نهایت این فاکتورها به

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 در نتیجه ایجاد تنش اکسیداتیو در اثر فناترن، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و شاخص پراکسیداسیون لیپیدی افزایش می‌یابد (Liu et al., 2009). همچنین گزارشات متعددی حاکی از متابولیزه شدن 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 P₄₅₀ 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 - گلوکاتیون 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 فناترن 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.

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 آلاننده‌های 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* به هم بخورد و در نتیجه 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 اسیدآمینو 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

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 و APX 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 مرستمی مرتبط است (Hare et al., 2001). افزایش پرولین نشانه‌ای برای تنش است. کمتر از ۰.۵٪ ذخیره کل

نشان داده شده است به دلیل 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 به نظر می‌رسد. این مسأله می‌تواند سنتز کلروفیل را مختل کند. در گیاهان برنج تیمارشده با فناترن 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 ۱۴ روز تیمار، باعث آسیب‌دیدگی و کاهش رشد ریشه و از بین رفتن 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.

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 لیسینتوس، به‌دنبال افزایش کاتالاز و کاهش H_2O_2 و در نتیجه کاهش آسیب به غشای پلاسمایی، مالون‌دی‌آلدئید کاهش می‌یابد.

فتوستتزی یکی از حساس‌ترین فرآیندهای متابولیکی است و مطالعات متعددی بازدارندگی فتوستتزی در گیاهان مختلف رشدیافته تحت تنش فلزات سنگین را گزارش کرده‌اند. این تنش کاهش فتوستتزی را ممکن است از طریق بازگشایی روزنه، آسیب به سازماندهی فراساختاری کلروپلاست، تغییر در متابولیت‌های فتوستتزی، جایگزینی یون‌هایی مانند منیزیم و منگنز و غیره با سرب در کلروپلاست و ممانعت از ساختن یا تجزیه رنگیزه‌های فتوستتزی 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، در نتیجه 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

منابع

- قناتی، ف. و نعمتی، ف. (۱۳۸۹) تأثیر مثبت آلومینیوم در فعال‌کردن سیستم آنتی‌اکسیدان ریشه‌های گیاه لیسینتوس (*Eustoma grandiflora* L.). زیست‌شناسی گیاهی ایران ۲: ۴۱-۵۳.
- 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.

- Adamia, G., Ghogoberidze, M., Graves, D., Khatishashvili, 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. *Annals 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 sativum* 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., Lopalbo, 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.

- 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 *Roystonea regia*. *Biochimica et Biophysica 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 erythrocyte. *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.

- 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 (*Helianthus 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 annuus* 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 Yoshida, 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.

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

Banafsheh Memarian, Maryam Khoshsookhan-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 disrupt 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 trichomes 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