

## اثر غلظت‌های مختلف پیرن بر مقدار رنگیزه‌های فتوستتزی و فعالیت آنزیم‌های پاداکساینده در گیاه آفتابگردان (*Helianthus annuus*)

مریم نعمتی، سیدیحیی صالحی‌لیسار\*، علی موافقی و روح الله متفکر آزاد

گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۹/۰۲؛ تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۰/۰۲/۲۱)

### چکیده

روند صنعتی شدن و افزایش جمعیت از دلایل عمده افزایش آلودگی محیط‌زیست با هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای می‌باشد. حضور این ترکیبات در محیط رشد گیاهان، سبب بروز انواع تنش‌ها و تحت تاثیر قرار گرفتن رشد آنها می‌شود. گیاهان می‌توانند این ترکیبات را از آب و خاک جذب کنند، بنابراین این مواد می‌توانند اثرات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی مختلف بر گیاهان داشته باشند. از سوی دیگر، گیاهان اولین حلقه از زنجیره‌های غذایی می‌باشند و هر گونه تاثیر زیانبار بر آنها، حیات و سلامت سایر موجودات زنده را به خطر می‌اندازد. از این رو در این تحقیق اثر غلظت‌های ۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از پیرن بر غلظت رنگیزه‌های فتوستتزی، فعالیت برخی آنزیم‌های پاداکساینده، محتوای مالون‌دی‌آلدئید و پراکسید هیدروژن گیاه آفتابگردان مورد بررسی قرار گرفت. برای این هدف گیاهچه‌های ۵۰ روزه تحت تیمارهای مختلف پیرن قرار گرفتند و شاخص‌های مورد نظر اندازه‌گیری شدند. پیرن سبب کاهش معنی‌دار در غلظت کلروفیل‌ها، فعالیت آنزیم کاتالاز، غلظت پراکسید هیدروژن و آنتوسیانین‌ها در مقایسه با شاهد گردید. از طرف دیگر، پس از تیمار پیرن غلظت کاروتنوئیدهای گیاه، فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز و همچنین شاخص مالون‌دی‌آلدئید در ریشه و اندام هوایی گیاه آفتابگردان افزایش یافت. طبق نتایج این تحقیق، پیرن احتمالاً با افزایش پراکسیداسیون لیپیدها، عامل تنش اکسیداتیو و در نتیجه کاهش مقدار رنگیزه‌های فتوستتزی و در نهایت بیومس و رشد گیاه می‌باشد.

واژگان کلیدی: آفتابگردان، آنزیم‌های پاداکساینده، پیرن، رنگیزه‌های فتوستتزی

### مقدمه

هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای (PAHs) (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) گروهی از مواد آلی فرار هستند که از لحاظ ظاهری بی‌رنگ، سفید و جامد می‌باشند (Haritash and Kaushik, 2009). این ترکیبات گروه بزرگ و متنوعی از آلاینده‌های آلی آب‌گریز هستند و به طور عمده از فعالیت‌های صنعتی و قسمتی از طریق فرایندهای طبیعی به محیط زیست

بر اساس نتایج تحقیقات انتشار یافته، بیش از ۲۰ درصد از اراضی کره زمین در معرض آلودگی‌های شیمیایی قرار دارند. حضور این آلاینده‌ها در محیط زیست علاوه بر به هم خوردن تعادل اکولوژیکی منطقه، با ورود به زنجیره غذایی، سلامت انسان، جانوران و گیاهان را تهدید می‌کند (بسالت پور، ۱۳۸۶).

\* نویسنده مسئول، نشانی پست الکترونیکی: y\_salehi@tabrizu.ac.ir

صورت ورود این ترکیبات به گیاهان اثرات نامطلوبی از قبیل کاهش تنفس، رنگیزه‌های فتوستتزی، تغییر فعالیت آنزیم‌ها و اثر بر تمامیت غشای سلول می‌گذارند (Tomar and Jajoo, 2014). PAHها می‌توانند با عبور از غشای سلول، جذب آب و مواد مغذی را کاهش دهند و منجر به اختلال در فتوستتز و انتقال الکترون شوند (Ma et al., 2010). تحقیقات اولیه روی این ترکیبات نشان داده است که هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای با کاهش فتوستتز و تنفس موجب آسیب به غشاهای سلولی می‌گردند و در نتیجه در سطح کل گیاه باعث کاهش رشد گیاه می‌شوند (Zhang et al., 2010 & Alarcon et al., 2006). مورفولوژی گیاه به عنوان شاخص مهمی برای اندازه‌گیری سمیت در برخی تحقیقات PAH در نظر گرفته شده است (Tomar and Jajoo, 2014). با این حال تغییرات **بیوشیمیایی می‌تواند** مقدم بر تغییرات ریخت‌شناسی و رشد باشد، زیرا درک بهتری از تأثیر PAHها در فرآیندهای متابولیسم گیاه فراهم می‌کند و داده‌هایی را که برای ارزیابی سمیت گیاهی این آلاینده‌ها و همچنین انتخاب گیاهان بالقوه برای پاکسازی PAH در خاک‌های آلوده مورد نیاز است، فراهم می‌کند (Na et al., 2019).

سمیت با PAHها، باعث القای تنش اکسیداتیو در بافت‌ها و سلول‌های گیاهی می‌شود و به این ترتیب سبب اختلال در **تعادل و افزایش** تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) می‌شود (Alkio, 2005). بنابراین دانش مولکولی برای یافتن سازوکارهای دفاعی درگیر در واکنش‌های تنشی، نیاز به یافتن راه‌هایی جهت حمایت از تحمل گیاه نسبت به ترکیبات آروماتیک دارد. یکی از این راه‌ها تقویت سیستم دفاعی آنزیمی و غیرآنزیمی می‌باشد تا گیاهان بتوانند اثرات تنش ایجاد شده را تعدیل کنند (Apel and Hirt, 2004). مشخص شده است که گیاهان با افزایش غلظت ترکیبات پاداکساینده و همچنین فعالیت آنزیم‌های پاداکسایشی به تنش اکسیداتیو پاسخ می‌دهند و گونه‌های فعال اکسیژن تولید شده را جاروب می‌کنند (Wen et al., 2008). نتایج تحقیقات Liu و همکاران (۲۰۰۹) نشان داده است که فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز،

(از جمله خاک) آزاد می‌شوند. مقاومت محیطی و سمیت آنها با افزایش وزن مولکولی افزایش می‌یابد و از این رو، تفاوت در وزن مولکولی یکی از فاکتورهای با اهمیت در خصوصیات PAHها است (Chauhan et al., 2008). پیرن یک هیدروکربن آروماتیک چهارحلقه‌ای می‌باشد، که حلقه‌ها در بیشتر از یک سمت به هم متصل می‌باشند (Aina et al., 2006). این ترکیب در آب کاملاً غیرمحلول است، اما در حلال‌های آلی حل می‌گردد و به علت وزن مولکولی بالا دارای توانایی انباشتگی در گیاهان و جانوران است (Ono-Ogasawara and Smith, 2004) به همین دلیل در موجوداتی که در زنجیره غذایی در جایگاه بالاتری قرار دارند، غلظت این ترکیب افزایش می‌یابد و با متابولیسم شدن در بدن آنها، متابولیت‌های سمی را تولید می‌کند که می‌توانند منجر به ایجاد سرطان و جهش شوند (Tian et al., 2019) با توجه توان سمیت زائی، آژانس حفاظت محیط زیست آمریکا ۱۶ ترکیب از PAHs را به منظور پایش در محیط معرفی کرده است (Gao and Zhu, 2004) و انجمن بین‌المللی سرطان ۱۵ ترکیب از آنها را به عنوان ترکیبات سرطان‌زا معرفی کرده است (Chauhan et al., 2008).

در طی سال‌های اخیر مطالعات متعددی بر روی سازوکار جذب PAHها توسط گیاهان انجام گرفته است و تحقیقات نشان داده‌اند که **این ترکیبات به دلیل آبگریز بودن و برقراری اتصال محکم با ذرات، در خاک تجمع می‌یابند** و از این رو اصلاح مکان‌های آلوده ضرورت می‌یابد (Piccardo et al., 2005). گیاهان می‌توانند PAHها را از طریق ریشه‌ها از خاک آلوده جذب کرده و متعاقباً آنها را به **اندام‌های هوایی** منتقل کنند (Kummerová et al., 2013). از سوی دیگر مشخص شده است که این ترکیبات می‌توانند توسط برگ گیاهان از اتمسفر نیز جذب شوند (Gao and Kuhn et al., 2004) و با وجود این، مطالعات کمی درباره ژن‌های گیاهی که مسئول جذب، تجزیه و احتمالاً پیوند PAH هستند انجام گرفته است (Sandermann et al., 1984) همچنین سازوکارهای ایجاد سمیت PAHها در گیاهان بسته به نوع و گونه گیاهی خاص متغیر است (Wilcke, 2009). در هر

مقدار لازم از آن در اتانول حل گردید و سپس با غلظت‌های صفر به عنوان شاهد، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر به محیط کشت حاوی پرلیت اضافه شد. سطوح تیمار با توجه به نتایج پیش آزمایش صورت گرفته با اعمال غلظت‌های صفر تا ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر از پیرن انتخاب شدند (نتایج نشان داده نشده‌اند). در نهایت پرلیت‌های تیمار شده به مدت ۴۸ ساعت در هوای آزاد قرار گرفتند تا اتانول موجود در آنها تبخیر گردد.

بذرهای ضد عفونی شده در گلدان‌های حاوی پرلیت تیمار شده با غلظت‌های ۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از پیرن کشت داده شدند و به مدت یک هفته در تاریکی قرار گرفتند. برای آبیاری گلدان‌ها از آب مقطر در حد ظرفیت مزرعه‌ای استفاده شد. بعد از جوانه‌زدن بذرها، دانه‌رست‌ها به شرایط گلخانه‌ای با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، دمای °C ۳۰-۲۵، رطوبت ۶۰-۵۰٪ و شدت نور ۶۰۰۰ لوکس منتقل گردیدند. سطح آب گلدان‌ها هر دو روز یکبار کنترل گردید و در حد ظرفیت مزرعه‌ای تنظیم شد. گلدان‌ها در هفته اول با آب مقطر آبیاری شدند. در هفته دوم محلول غذایی هوگلند ۵۰٪ و در هفته سوم روز محلول غذایی هوگلند ۱۰۰٪ به گلدان‌ها (هر دو در حد ظرفیت مزرعه‌ای) اضافه گردید. بعد از ۵۰ روز و مشاهده علائم تیمار با پیرن از نظر تفاوت در رشد، گیاهان به منظور انجام سنجش‌های مورد نظر برداشت شدند (Salehi-Lisar et al., 2015).

#### سنجش رنگیزه‌های فتوستتزی: برای سنجش رنگیزه‌های

فتوستتزی شامل کلروفیل a، b و کاروتنوئیدها از روش Lichtenthaler (۱۹۸۷) استفاده شد. بر این اساس، یک گرم از برگ تازه گیاهی در هاون چینی حاوی ۵ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد کاملاً هموژن گردید. سپس محلول به دست آمده با کاغذ صافی، صاف شد و در نهایت جذب نوری محلول به دست آمده، در طول موج‌های ۶۶۲، ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در مقایسه با شاهد (استون) قرائت گردید. غلظت کلروفیل‌های a، b و کاروتنوئیدها با استفاده از روابط زیر محاسبه گردید.

$$\text{Chl } a = 11/24A_{662} - 2/0.4A_{645}$$

پراکسیداز، کاتالاز و گلوکاتایون ترانسفراز و همچنین محتوای پراکسید هیدروژن و شاخص مالون‌دی‌آلدئید در اثر تیمار فناترن (به عنوان یک ترکیب PAH با انتشار بالا در محیط) در گیاه آرابیدوپسیس تالیانا (*Arabidopsis thaliana*)، افزایش می‌یابند. PAHها افزایش روزافزونی در محیط زیست دارند و گیاهان به عنوان تولیدکننده اولیه در زنجیره غذایی، بیش از سایر موجودات زنده تحت تاثیر آلودگی‌های زیست‌محیطی قرار می‌گیرند (Kummerova et al., 2006). آفتابگردان با نام علمی *Helianthus annuus* L. از خانواده Asteraceae گیاه بومی آمریکای مرکزی، گرم‌سند، دارای برگ‌های قلبی شکل، ساقه خشن و پوشیده از کرک‌های نسبتاً زبر است که بیشتر به عنوان گیاه زینتی کاربرد دارد و دانه‌های روغنی آن مورد استفاده قرار می‌گیرد (Yaseen et al., 2016). پیش از این تحقیقی در مورد پاک‌سازی آلاینده‌های آلی و غیر آلی از محیط توسط این گیاه انجام شده است (Heidari, 2013)، ولی هیچ پژوهشی در مورد ارزیابی پتانسیل گیاه آفتابگردان از نظر میزان تحمل، رشد و پاسخ‌های فیزیولوژیکی به PAHها در دسترس نیست. با توجه به ارزش اقتصادی و کشاورزی آفتابگردان و همچنین برای فهم سازوکارهای اثر این مواد بر رشد و نمو گیاهان، مطالعه اخیر با هدف بررسی غلظت‌های مختلف پیرن به عنوان یک ترکیب فراوان و سمی از PAHها بر شاخص‌های فیزیولوژیک و فعالیت آنزیم‌های پاداکساینده انجام گرفت.

#### مواد و روش‌ها

این تحقیق در سال ۱۳۹۷ تحت شرایط گلخانه‌ای در دانشکده علوم طبیعی دانشگاه تبریز بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار و به صورت گلدانی انجام شد. بذر گیاه آفتابگردان (*Helianthus annuus*) رقم هیبرید فرخ) از مرکز تحقیقات کشاورزی و اصلاح نهال و بذر کرج تهیه شد. به منظور جلوگیری از آلوده شدن گیاهان هنگام کشت، بذرها به وسیله قارچ کش توپسین‌ام ۷۰٪ ضد عفونی و تا زمان کاشت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد یخچال نگه‌داری شدند (Salehi-Lisar et al., 2015). برای آماده‌سازی تیمارهای پیرن، ابتدا

$$A = A_{530} - 0.25 \times A_{657}$$

A: جذب محلول (اعداد اندیس نشانگر طول موج‌هایی است که جذب در آنها اندازه‌گیری شد).

**سنجش پراکسید هیدروژن:** غلظت پراکسید هیدروژن مطابق روش Harinasut و همکاران (۲۰۰۳) انجام شد. نمونه گیاهی با استفاده از محلول ۰/۱ درصد از تری کلرواستیک اسید هموزن شد و ۱۵ دقیقه در  $10000 \times g$  سانتریفوژ گردید. سپس ۰/۵ لیتر از روشناو با ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار (pH=7) و یک میلی‌لیتر یدورپتاسیم یک میلی‌مولار مخلوط گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای  $25^\circ C$  قرار گرفت. در نهایت جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۳۹۰ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر سنجیده شد و با استفاده از منحنی استاندارد تهیه شده از غلظت‌های مختلف پراکسید هیدروژن (۱۲۰-۰ میکرومول) غلظت پراکسید هیدروژن محاسبه شد و بر حسب میکرومول برگرم وزن تر بیان گردید.

**سنجش فعالیت آنزیم‌های پاداکساینده:** همزمان با سنجش فعالیت آنزیم‌های پاداکساینده و به منظور محاسبه فعالیت ویژه آنزیم‌ها، غلظت پروتئین محلول کل نمونه‌ها با روش Bradford (۱۹۷۶) و پس از تهیه عصاره با استفاده از بافر فسفات سرد (PBS, 50 mM, pH = 7) انجام شد.

**سوپراکسید دیسموتاز:** فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز از طریق اندازه‌گیری میزان ممانعت از احیاء نوری نیتروبلوتترازولیوم (NBT) با عصاره آنزیمی انجام گرفت (Winterbourn *et al.*, 1997). در این روش آنیون سوپراکسید ( $O_2^-$ ) که توسط فتولیز ریبوفلاوین تولید شد، NBT را به ترکیب ارغوانی دی‌فرمازون احیاء کرد. برای سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، عصاره آنزیمی در بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار استخراج شد. محلول واکنش که شامل ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی، ۱۰۰ میکرولیتر NBT ۱/۵ میلی‌مولار، ۱۰۰ میکرولیتر EDTA ۰/۱ میلی‌مولار حاوی سدیم سیانید ۰/۳ میلی‌مولار و ۲۷۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۶۰ میلی‌مولار با pH=7/8 بود به مدت ۸-۵ دقیقه در شدت نور یکسان (۴۰ وات) قرار گرفت. بعد از این مدت ۵۰ میکرولیتر ریبوفلاوین

$$Chl\ b = 20/13A_{645} - 4/19A_{667}$$

$$Car\ t = 1000A_{470} - 1/9A\ C_a - 63/14C_b / 214$$

که در آنها Chl a: میزان کلروفیل a، Chl b: میزان کلروفیل b، Car t: میزان کاروتنوئید کل می‌باشد.

**سنجش مالون‌دی‌آلدئید:** به منظور برآورد میزان پراکسیداسیون لیپیدها و ارزیابی میزان حساسیت گیاهان به تنش اکسیداتیو، سنجش غلظت مالون‌دی‌آلدئید به عنوان یک مارکر زیستی، صورت گرفت (Boominathan and Doran, 2002). برای این کار ۰/۵ گرم از بافت تازه گیاهی در محلول ۰/۱٪ (W/V) از تری‌کلرواستیک اسید (TCA) استخراج گردید و سپس محلول حاصل به مدت ۵ دقیقه در  $10000 \times g$  سانتریفوژ شد. سپس روشناور با محلول ۲۰٪ TCA حاوی ۰/۵٪ تیوباربی‌توریک اسید (TBARS) به نسبت ۱ به ۴ در لوله آزمایش با هم مخلوط شدند. مخلوط به دست آمده به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و بلافاصله در حمام یخ سرد شد و سپس در  $10000 \times g$  به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. همزمان محلول‌های استاندارد در محدوده صفر تا ۱۰۰ نانومول از ۳،۱،۱،۳ تترا اتوکسی پروپان آماده گردید و جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۳۲ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر سنجیده شد. سپس مقدار مالون‌دی‌آلدئید نمونه‌ها به صورت میکرومول برگرم بافت تر گیاه محاسبه گردید.

**سنجش آنتوسیانین کل:** سنجش آنتوسیانین کل به روش Mita و همکاران (۱۹۹۷) انجام شد. برای این منظور، ۰/۵ گرم از بافت تازه گیاهی با ۵ میلی‌لیتر محلول اسید کلریدریک (HCl) یک درصد حاوی متانول کاملاً هموزن شد و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری گردید. سپس محلول به دست آمده به مدت ۱۰ دقیقه در  $10000 \times g$  سانتریفوژ شد. جذب محلول‌ها توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج‌های ۶۵۷ و ۵۳۰ نانومتر در مقایسه با شاهد (محلول اسید کلریدریک ۱٪ حاوی متانول مورد اندازه‌گیری قرار گرفت و نهایتاً غلظت آنتوسیانین کل نمونه‌ها با استفاده از فرمول زیر تعیین و بر حسب میلی‌گرم بر گرم بافت تر گیاه گزارش گردید.

خاموشی پراکسید هیدروژن (۴۰ میلی مولار بر سائتی‌متر) محاسبه و فعالیت ویژه آنزیم به صورت واحد بر میلی‌گرم پروتئین گزارش گردید.

**آنالیز آماری:** تجزیه واریانس نتایج به کمک نرم افزار spss انجام شد و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از روش دانکن با ضریب اطمینان ۹۵ درصد ( $p \leq 0/05$ ) مورد بررسی قرار گرفت. نمودارها با استفاده از نرم افزار اکسل نسخه ۲۰۱۶ ترسیم شدند.

### نتایج

**رنگیزه‌های فتوستتزی:** تیمار پیرن به طور کلی باعث کاهش غلظت کلروفیل‌های a و b در گیاه آفتابگردان نسبت به گیاهان شاهد گردید (جدول ۱). غلظت کلروفیل‌های a و b به ترتیب کاهش ۲۰/۰۶ درصدی و ۵۰/۴۰ درصدی در تیمار ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر نسبت به گیاهان شاهد نشان دادند ( $p \leq 0/05$ ). غلظت کلروفیل کل سطح ۵۰ میلی گرم بر لیتر از پیرن تغییر قابل ملاحظه ای با گیاهان شاهد نداشت، اما در سطح ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر کاهش معنی‌دار ۱۷/۰۳ درصدی نشان داد. همچنین تیمار پیرن در سطح ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر، به ترتیب موجب افزایش ۲/۳ و ۲/۴۷ برابر در غلظت کاروتنوئید کل در مقایسه با گیاهان شاهد گردید، اما بین تیمارهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر از پیرن تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ( $p \leq 0/05$ ) (جدول ۱).

**فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز:** فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در اندام‌های هوایی و ریشه گیاه آفتابگردان به صورت معنی‌داری با تیمار پیرن افزایش یافت ( $p \leq 0/05$ ) به طوری که فعالیت آن در ریشه و اندام‌های هوایی گیاهان تیمار شده با ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر از پیرن نسبت به شاهد به ترتیب ۲/۶۶ برابر و ۷۴/۱۱ درصد بیشتر بود (شکل ۱).

**فعالیت آنزیم پراکسیداز:** فعالیت آنزیم پراکسیداز در ریشه و اندام‌های هوایی گیاه آفتابگردان تیمار شده با پیرن نسبت به گیاهان شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد. در اندام‌های هوایی در سطح ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر از پیرن حداکثر

به محلول اضافه گردید و به مدت ۱۲ دقیقه در شدت نور یکسان و دمای مناسب قرار گرفت. در نهایت جذب نمونه‌ها با اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و فعالیت ویژه آنزیم بر حسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین بیان گردید.

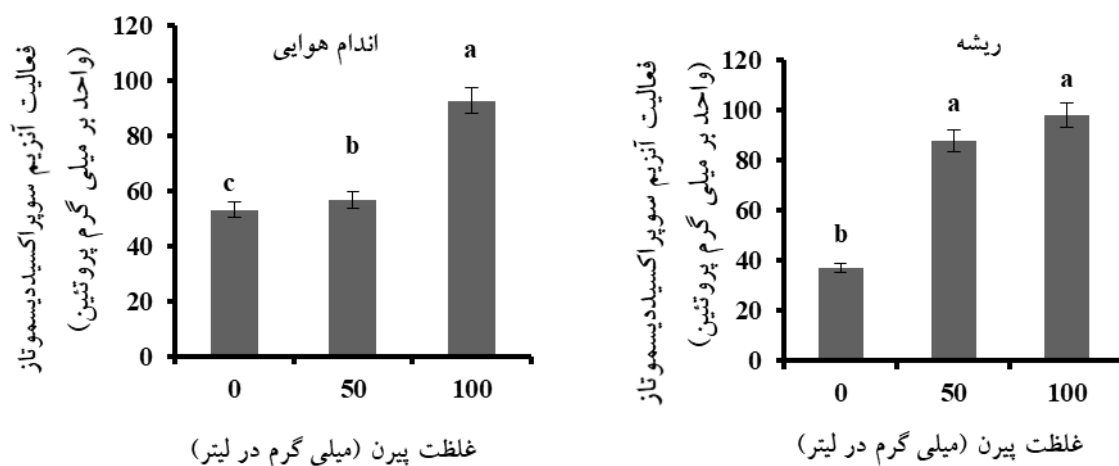
**سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز:** فعالیت آنزیم پراکسیداز (EC1.11.1.7) بر اساس روش Maehly و Chance (۱۹۵۵) مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. عصاره آنزیمی در بافر فسفات پتاسیم با غلظت ۱۰ میلی مولار و  $pH=7$  استخراج و به مدت ۱۰ دقیقه با  $10000 \times g$  سانتریفوژ گردید. سنجش فعالیت پراکسیداز در ۳۵۰ میکرولیتر از بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی مولار  $pH=7$ ، ۳۰۰ میکرولیتر گایاکول ۴ میلی مولار، ۳۰۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۵ میلی مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی انجام گرفت. واکنش با اضافه شدن عصاره آنزیمی در ۲۵ درجه سانتی‌گراد آغاز و جذب نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر به مدت سه دقیقه در طول موج ۴۷۰ نانومتر مورد سنجش قرار گرفت. مقدار آنزیم لازم جهت اکسیداسیون یک میکرومولار گایاکول به تترآگایاکول به عنوان یک واحد فعالیت آنزیم در نظر گرفته شد. همچنین فعالیت ویژه آنزیم بر حسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین اعلام گردید.

**سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز:** فعالیت آنزیم کاتالاز (EC1.11.1.6) بر اساس روش Maehly و Chanc (۱۹۹۵) و طبق کاهش جذب نوری پراکسید هیدروژن در طول موج ۲۴۰ نانومتر سنجش گردید. مطابق این روش عصاره آنزیمی در بافر فسفات پتاسیم با غلظت ۵۰ میلی مولار و  $pH=7$  استخراج گردید و به مدت ۱۰ دقیقه با دور  $10000 \times g$  سانتریفوژ شد. جهت سنجش فعالیت آنزیم مقدار ۵۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی به محلول واکنش شامل ۱۹۵۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار با  $pH=7$  و یک میلی لیتر پراکسید هیدروژن ۱۰ میلی مولار اضافه و تغییرات جذب با دستگاه اسپکتروفتومتر به مدت سه دقیقه اندازه‌گیری شد. یک واحد فعالیت، مقدار CAT لازم برای احیا یک میکرومول پراکسید هیدروژن در دقیقه در نظر گرفته شد. سرانجام فعالیت کاتالاز بر اساس ضریب

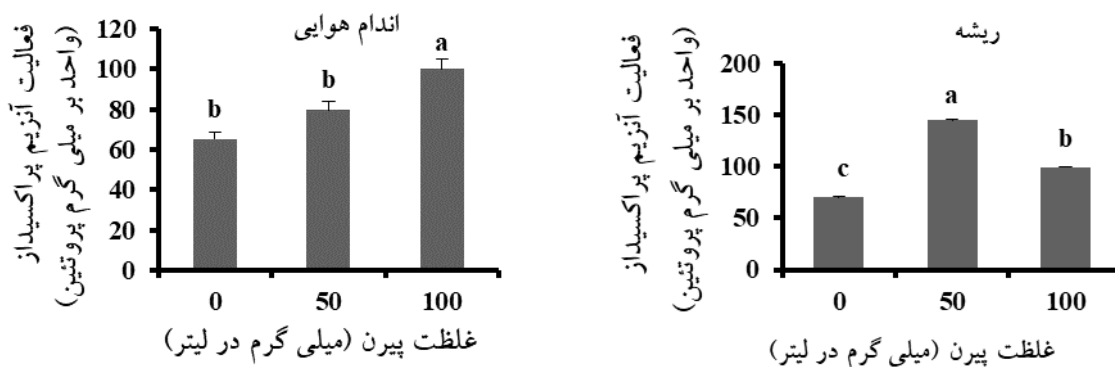
جدول ۱- اثر غلظت‌های مختلف پیرن بر مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی (میکروگرم بر گرم وزن تر) گیاه آفتابگردان.

تیما	غلظت	کاروتنوئید	کلروفیل کل	کلروفیل b	کلروفیل a
	(میلی گرم بر لیتر)		(میکروگرم بر گرم وزن تر)		
شاهد	۰	۵۲/۳۹±۲/۴۴ b	۳۶۶/۷۹±۱۲/۰۱ a	۱۲۱/۴۸±۱۲/۴۲ a	۲۴۵/۳۴±۴/۰۶ a
پیرن	۵۰	۱۲۰/۳۹±۲/۳۴ a	۳۵۷/۵۱±۲۳/۵۱ a	۸۹/۶۶±۲/۳۱ b	۲۱۲/۱۷±۲۹/۰۰ b
	۱۰۰	۱۲۹/۳۳±۲/۳۴ a	۳۰۴/۳۰±۱/۱۸ b	۶۰/۲۵±۵/۳۲ c	۱۹۶/۱۲±۱۶/۲۹ c

داده‌ها میانگین سه تکرار ± خطای استاندارد هستند و حروف یکسان در هر ستون نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۰.۰۵ می‌باشد



شکل ۱- تاثیر غلظت‌های مختلف پیرن بر فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در ریشه و اندام‌هوایی گیاه آفتابگردان. داده‌ها میانگین سه تکرار ± خطای استاندارد هستند و حروف یکسان در هر ستون نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۰.۰۵ می‌باشد.

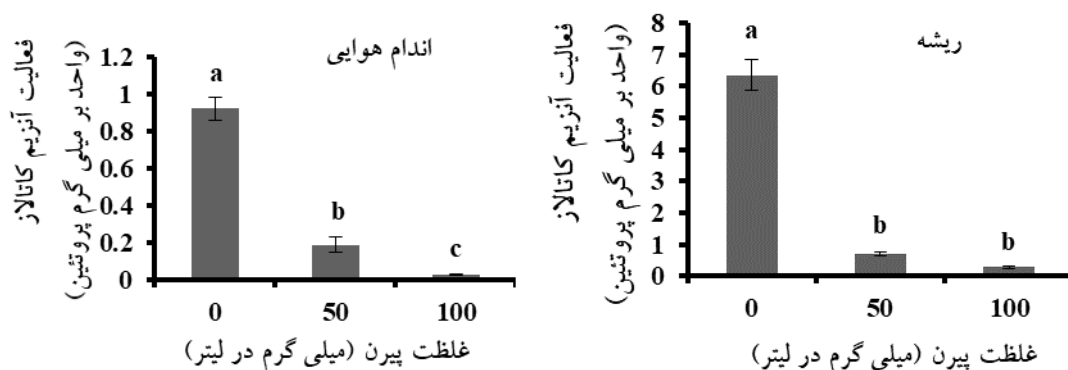


شکل ۲- تاثیر غلظت‌های مختلف پیرن بر فعالیت آنزیم پراکسیداز در ریشه و اندام‌هوایی گیاه آفتابگردان. داده‌ها میانگین سه تکرار ± خطای استاندارد هستند و حروف یکسان در هر ستون نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۰.۰۵ می‌باشد.

بود. بین تیمارهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از پیرن هم اختلاف معنی‌دار وجود داشت ( $p \leq 0.05$ ) (شکل ۲).

آنزیم کاتالاز: فعالیت آنزیم کاتالاز در اندام‌های هوایی و

فعالیت آنزیم مشاهده شد که ۵۳/۵۹ درصد بیشتر از گیاهان شاهد بود. اما بیشترین فعالیت آنزیم در ریشه در سطح ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر ثبت گردید که ۲/۰۷ برابر بیشتر از گیاهان شاهد



شکل ۳- تاثیر غلظت‌های مختلف پیرن بر فعالیت آنزیم کاتالاز در ریشه و اندام‌هوایی گیاه آفتابگردان. داده‌ها میانگین سه تکرار ± خطای استاندارد هستند و حروف یکسان در هر ستون نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ می‌باشد.

جدول ۲- اثر غلظت‌های مختلف پیرن بر محتوای آنتوسیانین، مالون‌دی‌آلدئید و پراکسید هیدروژن گیاه آفتابگردان.

تیمار	اندام‌های هوایی			ریشه		(میلی گرم بر لیتر)	
	آنتوسیانین	مالون‌دی	پراکسید	مالون‌دی	پراکسید		
شاهد	۳/۵۲±۰/۱۶ <sup>a</sup>	۲/۹۵±۰/۱۳ <sup>c</sup>	۸۵/۶۶±۴/۱۶ <sup>c</sup>	۶/۲۵±۰/۰۶ <sup>c</sup>	۹/۵۷±۰/۱۴ <sup>a</sup>	۰	
پیرن	۱/۵±۰/۰۳ <sup>b</sup>	۶/۴۵±۰/۱۹ <sup>b</sup>	۱۳۵/۰۱±۲/۴ <sup>b</sup>	۱۰/۴۰±۰/۰۳ <sup>b</sup>	۳/۰۹±۰/۰۱ <sup>b</sup>	۵۰	
	۰/۹±۰/۰۲ <sup>b</sup>	۱۴/۰۸±۰/۱ <sup>a</sup>	۱۵۲/۳۳±۲/۷۲ <sup>a</sup>	۱۷/۲۳±۰/۰۸ <sup>a</sup>	۳/۰۳±۰/۰۲ <sup>b</sup>	۱۰۰	

داده‌ها میانگین سه تکرار ± خطای استاندارد هستند و حروف یکسان در هر ستون نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ می‌باشد.

پیرن باعث افزایش معنی‌دار غلظت مالون‌دی‌آلدئید در ریشه و اندام‌های هوایی گیاهان تیمار شده در مقایسه با گیاهان شاهد گردید ( $p \leq 0/05$ ). بیشترین غلظت مالون‌دی‌آلدئید در سطح ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به دست آمد، به طوری که در ریشه و اندام‌های هوایی به ترتیب افزایش ۲/۷۶ و ۴/۷۷ برابر در مقایسه با گیاه شاهد مشاهده شد (جدول ۲). غلظت پراکسید هیدروژن در اندام‌های هوایی و ریشه گیاهان آفتابگردان به صورت معنی‌داری با تیمار پیرن افزایش یافت به طوری که غلظت آن در ریشه و اندام‌های هوایی گیاهان تیمار شده با ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از پیرن نسبت به گیاهان شاهد به ترتیب ۲/۷ و ۱/۷۸ برابر بیشتر بود (جدول ۲).

ریشه گیاهان تیمار شده با هر دو غلظت پیرن به صورت معنی‌داری نسبت به گیاهان شاهد کاهش یافت ( $p \leq 0/05$ ). کمترین فعالیت آنزیم در تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد که در مقایسه با گیاهان شاهد در اندام‌های هوایی ۹۶/۷۳ درصد و در ریشه ۹۵/۵۹ کاهش نشان داد (شکل ۳).

#### غلظت آنتوسیانین، مالون‌دی‌آلدئید و پراکسید هیدروژن:

غلظت آنتوسیانین کل در اندام‌های هوایی و ریشه گیاهان تیمار شده با پیرن به صورت معنی‌داری کاهش یافت، ولی بین دو غلظت اعمال شده از پیرن اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ( $p \leq 0/05$ ). غلظت آنتوسیانین کل در اندام‌های هوایی و ریشه در سطح ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از پیرن به ترتیب کاهش معنی‌دار ۶۸/۳۴ و ۷۴/۴۳ درصدی نشان داد ( $p \leq 0/05$ ) (جدول ۲). تیمار

## بحث

قرار گرفتن گیاهان در معرض ترکیبات PAH نوعی تنش را در آنها ایجاد می کند که ممکن است باعث تحریک یا بازدارندگی فتوسنتز و تنفس شود (Tomar and Jajoo, 2014). در مطالعه‌ی حاضر مشخص گردید که تیمار پیرن باعث کاهش غلظت مولکول‌های کلروفیل می‌گردد که بیانگر این نکته است که احتمالاً پیرن در گیاه آفتابگردان، با تولید گونه‌های فعال اکسیژن آزاد سبب ایجاد تنش اکسیداتیو شده است. ROSها می توانند باعث پراکسیداسیون لیپیدها و آسیب به غشای دستگاه فتوسنتزی شوند و در نتیجه سبب تخریب کلروفیل گردند (Merati et al., 2016 & Shabrangi et al., 2015). نتایج مشابه توسط Liu و همکاران (۲۰۰۹) با مطالعه بر روی گیاه آرابیدوپسیس تالیانا تیمار شده با فنانترون گزارش شده است. نتایج Kummerova و همکاران (۲۰۰۶) نشان داده‌اند با افزایش غلظت ترکیبات PAH در محیط، رنگیزه‌های فتوسنتزی و به دنبال آن جذب CO<sub>2</sub> و فتوسنتز و تولید بیومس در نهایت کاهش می‌یابد، که از نتایج پژوهش حاضر حمایت می‌کند.

کاروتنوئیدها، گروهی از رنگیزه‌های فتوسنتزی با ساختار تتراترپنوئیدی هستند که در کلروپلاست و کروموپلاست گیاهان و دیگر موجودات فتوسنتزکننده وجود دارد (Lobato et al., 2009). در این تحقیق تیمار گیاهان با پیرن منجر به تغییر رنگ اندام‌های هوایی گردید. با توجه به اینکه مقدار کاروتنوئیدها در گیاهان تیمار شده افزایش نشان داد، از این رو نقش این رنگیزه‌ها به عنوان پاداکساینده و محافظت‌کننده در گیاهان تیمار شده با پیرن می‌تواند قابل توجه باشد زیرا این ترکیبات از گیاهان در مقابل ROSها محافظت می‌کنند و در حفظ تمامیت غشای لیپیدی نقش دارند (Kitahata et al., 2006).

در این مطالعه غلظت آنتوسیانین‌ها در اندام‌های هوایی و ریشه گیاهان تیمار شده با پیرن کاهش معنی‌داری را در مقایسه با شاهد نشان داد. آنتوسیانین‌ها یک گروه بزرگ از متابولیت‌های ثانویه هستند، که دارای خاصیت پاداکسایشی می‌باشند (Hoekstra et al., 2001). افزایش سنتز این ترکیبات تحت تنش‌های مختلف گزارش شده است که این افزایش می‌تواند

مربوط به نقش آنها در حفاظت نوری با حذف مستقیم گونه‌های فعال اکسیژن آزاد تحت شرایط تنش اکسیداتیو باشد (Zhang et al., 2010). اما در این تحقیق کاهش میزان آنتوسیانین احتمالاً بدنبال کاهش میزان کلروفیل بوده است. کاهش میزان کلروفیل در اثر تنش پیرن ممکن است به علت تخریب ساختار کلروفیل، ناپایداری کمپلکس‌های محافظت‌کننده‌ی دستگاه فتوسنتزی و افزایش فعالیت آنزیم کلروفیل‌لاز باشد که منجر به کاهش میزان کلروفیل و در نتیجه ساخت قند می‌شود. Bertrand و Schoefs (۱۹۹۹) نیز در گیاه کلزا، کاهش میزان آنتوسیانین را در شرایط تنش بدنبال کاهش محتوای کلروفیل‌ها و قندها گزارش کرده‌اند.

سیستم پاداکسایشی آنزیمی یکی از مهم‌ترین سازوکارهای گیاهان در مقاومت به تنش‌ها می‌باشد و میزان فعالیت آنزیم‌های پاداکساینده به نوع و مدت تنش، گونه گیاهی و بخش‌های مختلف گیاه وابسته است (Martía et al., 2009 & Hassanpour et al., 2017). مهم‌ترین آنزیم‌هایی که در جهت تحمل گیاه به تنش اکسایشی نقش عمده‌ای را ایفا می‌نمایند سوپراکسیددیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز می‌باشد (Wang et al., 2003). سوپراکسیددیسموتاز دارای نقش حفاظتی در مقابل ROSها میباشد و اولین سد دفاعی در برابر رادیکال سوپراکسید و تبدیل آنها به پراکسیدهیدروژن می‌باشد (Ghanati et al., 2005). در تحقیق حاضر، افزایش معنی‌دار در فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در اندام‌های هوایی گیاه آفتابگردان در سطح ۵۰ میلی‌گرم برلیتر بیانگر این مطلب است که رادیکال‌های سوپراکسید در این غلظت افزایش یافته‌اند و با افزایش فعالیت آنزیم، منجر به تبدیل رادیکال‌های مذکور به پراکسیدهیدروژن و آب شده‌اند. افزایش غلظت پراکسید-هیدروژن در گیاهان تیمار شده با پیرن نیز مؤید این مطلب می‌باشد. در مطالعه‌ای که روی گیاه آرابیدوپسیس تالیانا انجام گرفته است نیز افزایش فعالیت سوپراکسیددیسموتاز تحت تیمار فنانترون و پیرن مشاهده شده است (Mita et al., 1997). با توجه به اینکه پراکسیدهیدروژن تولیدی در گیاهان به عنوان یک محصول سمی و مضر محسوب می‌گردد، بنابراین تبدیل



آفتابگردان، گندم و یونجه تحت تیمار فناترن گزارش شده است.

فراوان‌ترین محصول سمی حاصل از پراکسیداسیون لیپیدها مالون‌دی‌آلدئید می‌باشد که معرف میزان تولید رادیکال‌های آزاد می‌باشد. این مولکول‌ها خود سبب آسیب به غشاء سلول شده و با تولید مالون‌دی‌آلدئید بیشتر، باعث پراکسیداسیون و تخریب لیپیدهای غشا می‌شوند (Mishra and Nautiyal, 2009). در این تحقیق با افزایش محتوای پراکسید هیدروژن، غلظت مالون‌دی‌آلدئید در گیاهان نیز افزایش نشان داد. با توجه به همبستگی مثبت میان این دو شاخص، می‌توان به نقش مستقیم پراکسید هیدروژن در تولید MDA و تخریب غشای سلولی اشاره کرد (Zhang et al., 2011). در واقع افزایش میزان MDA نشان دهنده کاهش شاخص پایداری غشای سلولی می‌باشد (Mishra and Nautiyal, 2009). بنابراین افزایش هر دو فاکتور پراکسید هیدروژن و مالون‌دی‌آلدئید، مؤید تنش اکسیداتیو القا شده در نتیجه سمیت آلودگی پیرن می‌باشد. در تحقیقی که توسط Zhang و همکاران (۲۰۰۷) انجام گرفته است، افزایش محتوای MDA به موازات افزایش پراکسید هیدروژن، در گیاه مانگرو تحت تنش آلودگی‌های نفتی گزارش گردیده است.

#### نتیجه‌گیری

کاهش فعالیت برخی آنزیم‌های پاداکساینده بویژه در غلظت-های بالای ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر پیرن و همچنین افزایش شاخص پراکسیداسیون لیپید نشان‌دهنده‌ی تنش شدید ناشی از این ترکیب در گیاه آفتابگردان می‌باشد. به نظر می‌رسد به علت افزایش تولید رادیکال‌های آزاد، گیاه آفتابگردان توان مقابله با تنش ناشی از سمیت بالای پیرن را ندارد و با کاهش رنگیزه‌های فتوسنتزی و آسیب به غشای سلولی، کاهش تولید بیومس و رشد گیاه اتفاق می‌افتد. بنابراین این گیاه در محیط‌های کشت خاکی و مزرعه‌ای آلوده به ترکیبات سمی بیش از دو حلقه مانند پیرن توصیه نمی‌شود و گیاه مناسبی برای زیست پالایی نمی‌باشد.

آن به آب و اکسیژن نیاز به فعال شدن آنزیم‌های پراکسیداز دارد تا وضعیت ردوکس سلولی حفظ گردد (Asada, 1999). در این پژوهش فعالیت آنزیم پراکسیداز در ابتدا با اضافه شدن پیرن به محیط کشت در سطح ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر در اندام‌های هوایی گیاه آفتابگردان افزایش یافت، اما با افزایش سطح تیمار به ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، در ریشه کاهش نشان داد. احتمالاً این افزایش بیانگر افزایش مقابله با اثرهای سوء تنش اکسیداتیو می‌باشد. همچنین نشان‌دهنده، فعال شدن سیستم دفاعی آنزیمی گیاه جهت پاکسازی پراکسید هیدروژن تولید شده توسط سوپراکسید دیسموتاز می‌باشد. به نظر می‌رسد حلقه‌های بنزنی پیرن با اکسید شدن و دادن الکترون به آنزیم پراکسیداز متلاشی می‌شوند و با فعال کردن آنزیم پراکسیداز زمینه را برای تجزیه پراکسید هیدروژن و ایجاد مقاومت در گیاه فراهم می‌کنند. اما کاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز در سطح ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر ممکن است به علت تنش شدید ناشی از این ترکیبات باشد که سیستم پاداکسایشی آنزیمی گیاه احتمالاً دیگر توان مقابله با رادیکال‌های آزاد ناشی از تنش بوجود آمده را نداشته‌اند. در گیاهان یونجه، آفتابگردان و گندم نیز افزایش فعالیت پراکسیداز در سطح ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر در اندام‌های هوایی و کاهش فعالیت در سطح ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در ریشه گزارش شده است (Salehi-lisar and Deljoo, 2015). همچنین یکی دیگر از آنزیم‌هایی که در سیستم پاداکسایشی آنزیمی گیاه برای مقابله با اثرهای سوء ناشی از پراکسید هیدروژن تولیدی توسط فعالیت سوپراکسید دیسموتاز، عمل می‌کند آنزیم کاتالاز می‌باشد. در این مطالعه تیمار پیرن سبب کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم کاتالاز در هر دو بخش اندام‌های هوایی و ریشه شد. نکته قابل توجه کاهش شدیدتر فعالیت آنزیم در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پیرن بود. کاهش فعالیت آنزیم ممکن است به علت افزایش ROSها و تغییر یا برهمکنش پیش واحدهای ساختاری آنزیم فوق با گونه‌های فعال اکسیژن آزاد، به‌ویژه در سطح ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر باشد (Cho and Seo, 2005). نتایج مشابه توسط Muratova و همکاران (۲۰۰۹) در ارتباط با گیاهان

## منابع

بسالته پور، ا. (۱۳۸۶) زیست‌پالایی خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی به روش فیتوریمیڈیشن. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران.

- Aina, R., Plain, L. and Citterio, S. (2006) Molecular evidence for benzo (a) pyrene and naphthalene genotoxicity in (*Trifolium repens* L). *Chemosphere* 65: 666–673.
- Alarcon, A., Delgadillo, J., Franco-Ramirez, A., Davies, F. and Ferrera-Cerrato, R. (2006) Influence of two polycyclic aromatic hydrocarbons on spore germination, and phytoremediation potential of *gigaspora margarita* *echynochloa polystachys* symbiosis in benzo (a) pyrene-polluted substrate. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental* 22: 39–47.
- Alkio, M. (2005) Aromatic hydrocarbons in (*Arabidopsis thaliana*) include growth inhibition and hypersensitive response like symptoms. *Journal of Experimental Botany* 56: 2983-2994.
- Apel, K. and Hirt, H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Reviews of Plant Biology* 55: 373-399.
- Asada, K. (1999) The water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Biology* 50: 601-639.
- Bertrand, M. and Schoefs, B. (1999) Photosynthetic pigment metabolism in plants during stress in handbook of plant and crop stress. Marcel Dekker, New York 101: 527-543.
- Boominathan, R. and Doran, P. M. (2002) Ni induced oxidative stress in roots of the Ni hyperaccumulator (*Alyssum bertoloni*). *New Phytologist* 156: 205-215.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Chance, B. and Maehly, A. C. (1995) Assay of catalase and peroxidases. *Methods of Enzymology* 11: 764-775.
- Chauhan, A., Fazlurrahman-Oakeshott, J. G. and Jain, R. K. (2008) Bacterial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbon: strategies for bioremediation. *Indian Journal of Microbiology* 48: 95-113.
- Cho, U. H. and Seo, N. H. (2005) Oxidative stress in (*Arabidopsis thaliana*) exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. *Plant Science* 168: 113-120.
- Gao, Y. and Zhu, L. (2004) Plant uptake, accumulation and translocation of phenanthrene and pyrene in soil. *Chemosphere* 55: 1169-1178.
- 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.
- Harinasut, P., Poonsopa, D., Roengmongkol, K. and Charoensalporn, R. (2003) Salinity effects on antioxidant enzymes in mulburg cultivar. *Asian Journal of Scientific Research* 29: 109-113.
- Haritash, A. K. and Kaushik, C. P. (2009) Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons. *A Review Journal of Hazardous Materials* 169: 1-15.
- 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.
- Hassanpour, H., Niknam, V. and Haddadi, B-S. (2017) High-frequency vibration improve callus growth via antioxidant enzymes induction in *Hyoscyamus kurdicus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 128: 231-241.
- Hoekstra, F. A., Golovina, E. A. and Buitink, J. (2001) Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science* 6: 431-438.
- Kitahata, N., Kobayashi, M. and Asami, T. (2006) A 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase inhibitor for use in the elucidation of aba action mechanisms. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 14: 5555-5561.
- Kuhn, A., Ballach, H.-J. and Wittig, R. 2004. Studies in the biodegradation of 5 PAHs (Phenanthrene, pyrene, fluoranthene, chrysene und benzo (a) pyrene) in the presence of rooted poplar cuttings. *Environmental Science and Pollution Research* 11: 22-32.
- Kummerova, M. J., Krulov, S., Zezulka, J. and Triska, J. (2006) Evaluation of fluoranthene phytotoxicity in pea plants by hill reaction and chlorophyll fluorescence. *Chemosphere* 65: 489-496.
- Kummerová, M., Zezulka, S., Babula, P. and Vanova, L. (2013) Root response in (*Pisum sativum*) and (*Zea mays*) under fluoranthene stress: morphological and anatomical traits. *Chemosphere* 90: 665-673.
- Lichtenthaler, H. K. (1987) Chlorophylls and carotenoids, the pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 14: 8 350-382.
- Yaseen, A. A. M., Khalidah, M. S., Basim, S. and Wasan, M. H. (2016) Effect of Foliar Spray of Nano Silver and Organic Fertilizer (Algastar) and Salicylic Acid on Some Morphological Characteristics and Carbohydrate Content in (*Helianthus annuus* L.). *Journal of Agriculture and Ecology Research International* 5: 1-7.

- 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.
- Liu, H. D., Weisman, Y. B., Ye, B., Cui, Y. H., Huang, A., Colon-Carmona, A. and Wang, Z. H. (2009) An oxidative stress response to polycyclic aromatic hydrocarbon exposure is rapid and complex in (*Arabidopsis thaliana*). *Plant Science* 176: 375-382.
- Lobato, A. K. S., Costa, R. C. L., Neto, M. A. M., Neto, O., Santos, C. F., Filho, B. G., Alves, G. A. R., Freitas, J. M. N. and Coimbra, G. K. (2009) Responses of the photosynthetic pigments and carbon metabolism in (*Vigna unguiculata*) Cultivars submitted to water deficit. *Research Journal of Biological Science* 4: 593-597.
- 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.
- Martía, M. C., Camejoa, D., Fernández, N., Rellán, A. R., Marquesc, S., Sevilla, F. and Jiménez, A. (2009) Effect of oil refinery sludges on the growth and antioxidant system of alfalfa plants. *Journal of Hazardous Materials* 171: 879-885.
- Merati, M-J., Niknam, V., Hassanpour, H. and Mirmasoumi, M. (2016) Comparative effects of salt stress on growth and antioxidative responses in different organs of pennyroyal (*Mentha pulegium* L.). *Journal of Plant Research* 28 : 1097-1107.
- Mishra, A. and Nautiyal, C. (2009) Functional diversity of the microbial community in the rhizospherae of chickpea grown in diesel fuelspiked soil amended with (*Trichoderma resei*) using sole-crbon source utilization profiles. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25: 1175-1180.
- Mita, S., Murano, N., Akaike, M. and Nakamura, K. (1997) Mutants of (*Arabidopsis thaliana*) with pleiotropic effects on the expression of the gen for beta-amylase and on the accumulation of anthocyanin that are inducible by sugars. *Plant Journal* 11: 841- 851
- Muratova, A. Y., Kapitonova, V. V., Chernyshova, M. P. and Turkovskaya, O. V. (2009) Enzymaticactivity of alfalfa in a phenanthrene contaminated environment. *World Academy of Science Engineering and Technology* 58: 569-574.
- Na, C. J., Yoo, M. J., Tsang, D.C., Kim, H. W. and Kim, K. H. (2019) High-performance materials for effective sorptive removal of formaldehyde in air. *Journal of Hazardous Materials*. 366: 452-465.
- Ono-Ogasawara, M. and Smith, T. (2004) Diesel exhausts particles in the work environment and their analysis. *Industrial Health* 42: 389-399.
- Piccardo, M. T., Pala, M., Bonaccorso, B., Stella, A., Redaelli, A., Paola, G. and Valerio, F. (2005) *Pinus nigra* and *Pinus pinaster* needles as passive samplers of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Pollutants* 133: 293-301.
- Salehi-Lisar, S. Y. and Deljoo, S. (2015) Physiological effect of phenanthrene on (*Triticum aestivum* L., *Helianthus annus* and *Medicago sativa*). *Eurasian Journal of Biosciences*. 9: 29-37.
- Salehi-Lisar, S. Y., Deljoo, S. and Harzandi, A. M. B. (2015) Fluorene and phenanthrene uptake and accumulation by wheat, alfalfa and sunflower from the contaminated soil. *International Journal of Phytoremediation* 17: 1145-1152.
- Sandermann, H., Scheel, D. and Trenck, T. (1984) Use of plant cell cultures to study the metabolism of environmental chemicals. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 8: 167-182.
- Tian, L., Yin, S., Ma, Y., Kang, H., Zhang, X., Tan, H. A. and Liu, C. (2019) Impact factor assessment of the uptake and accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by plant leaves: morphological characteristics have the greatest impact. *Science of the Total Environment* 652: 1149-1155.
- Tomar, R. S. and Jajoo, A. (2014) Fluoranthene, a polycyclic aromatic hydrocarbon, inhibits light as well as dark reactions of photosynthesis in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Ecotoxicology environmental Safety* 109: 110-115.
- Shabrangi, A., Hassanpour, H., Majd, A. and Sheidai, M. (2015) Induction of genetic variation by electromagnetic fields in (*Zea mays* L.) and (*Brassica napus* L.). *International Journal of Cytology Cytosystematics and Cytogenetics* 68: 272-279.
- Wang, W., Vinocur, B. and Altman, A. (2003) Plant responses to drought salinity and extreme temperatures. *Planta* 218: 1-14.
- Wen, P. F., Chen, J. Y., Wan, S. B., Kong, W. F., Zhang, P., Wang, W., Zhan, J., Pan, Q. H. and Hung, W. D. (2008) Salicylic acid activates phenylalanine ammonia lyase in grape berry in response to high temperature stress. *Plant Growth Regulation* 55: 1-10.
- Winterbourn, C. C., Mcgrath, B. M. and Carrell, R. W. (1977) Reactions involving superoxide and normal and unstable hemoglobins. *Biochemical Journal* 155: 493-502.
- Wilcke, W. (2009) Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 163: 229-248.
- Zhang, F. Q., Wang, Y. S., Lou, Z. P. and Dong, J. D. (2007) Effect of heavy metal stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two mangrove plant seedlings. *Chemosphere* 67: 44-50.
- Zhang, K. M., Yu, H. J., Shi, K., Zhou, Y. H., Yu, J. Q. and Xia, X. J. (2010) Photoprotective roles of anthocyanins in (*Begonia semperflorens*). *Plant Science* 17: 202-20.

Zhang, X. X., Liu, S., Liu, F., Liu, L., Chen, G., Xu, C., Zhong, P. and Cao, S. U. Z. (2011) Responses of (*Scirpus triqueter*), soil enzymes and microbial community during phytoremediation of pyrene contaminated soil in simulated wetland. *Journal of Hazardous Materials* 193: 45-51.

## The effect of different concentrations of pyrene on photosynthetic pigment content and antioxidant enzyme activities in sunflower (*Helianthus annuus*)

Maryam Nemati, Seyed Yahya SalehiLisar\*, Ali Movafeghi and, Rouhollah Motafakkerzad

Department of Plant Science, Faculty of Natural Sciences

(Received: 22/11/2020; Accepted: 11/05/2021)

### Abstract

World industrialization and population growth are the main reasons for the increase of environmental contamination with aromatic hydrocarbons. The presence of these compounds in the environment leads to a variety of stresses in plants and finally reduces their growth. Pyrene is one of the major toxic contaminants belonging to polycyclic aromatic hydrocarbons. Hence, in this research, the effect of 50 and 100 ppm of pyrene on growth indices, photosynthetic pigment contents, the activity of some antioxidant enzymes, malondialdehyde content, and amount of hydrogen peroxide in sunflower were examined. Pyrene significantly reduced chlorophyll, and anthocyanin contents, catalase activity, as well as hydrogen peroxide content compared to the control, while the amount of plant carotenoids, the activity of superoxide dismutase and peroxidase enzymes as well as malondialdehyde content were increased in the roots and shoots of sunflower. Based on the obtained results, pyrene probably caused an oxidative stress and lipid peroxidation that eventually reduced photosynthetic pigments and plant growth.

**Keywords:** Sunflower, Antioxidant enzymes, Pyrene, Photosynthetic pigments

Corresponding author, Email: y\_salehi@tabrizu.ac.ir