

## تأثیر آنتراسن بر فاکتورهای استرس اکسیداتیو در گیاه یونجه (*Medicago sativa* L.)

لیلا جعفری<sup>۱</sup>، مریم خوش سخن مظفر<sup>۲\*</sup>، الهه وطن خواه<sup>۲</sup>

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران

۲. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۳/۲۵؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۸/۰۵)

### چکیده

آلودگی‌های نفتی آروماتیکی یکی از تنش‌های محیطی هستند که رشد گیاه را مهار می‌کنند و تعادل بین تولید گونه‌های اکسیژن واکنشی و فعالیت دفاعی آنتی اکسیدانتی را به هم می‌زنند. برخی گیاهان دارای سیستم ریشه‌ای ارزشمندی هستند که می‌توانند ترکیبات آلی مانند هیدروکربن‌های آروماتیکی چند حلقه‌ای را دور کنند. در بین هیدروکربن‌های آروماتیکی، آنتراسن از سمی‌ترین و سرطان‌زاترین ترکیباتی است که تاکنون، توسط آژانس محافظت از محیط زیست آمریکا شناخته شده است. این ماده در مراحل مختلف فیزیولوژیکی تأثیر می‌گذارد. در این مطالعه هدف بررسی اثر غلظت‌های متفاوت آنتراسن بر القا تنش اکسیداتیو در گیاه یونجه می‌باشد. در ابتدا بذرها در چهار گروه شاهد، حلال استن، تیمار ۲ و ۴ میلی مولار در ظروف پتری جوانه زدند. دانه رست‌ها به محیط آبکشت منتقل شده و بعد از ۱۲ روز تیمار با آنتراسن، بافت‌های اندام هوایی و ریشه این گیاهان برداشت شدند و جهت سنجش پارامترهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی مورد استفاده قرار گرفتند. بر بنای نتایج به دست آمده، فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت در ساقه در تیمار با آنتراسن افزایش یافت. آنتراسن سطح پراکسیداسیون لیپیدی را در در ساقه کاهش داد اما در ریشه این میزان افزایش معنی داری در سطح ۰/۰۵ را نشان داد که این مساله همراه با افزایش غلظت کلروفیل بود. به دنبال افزایش آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز به منظور حذف رادیکال سوپراکسید، فعالیت آنزیم‌های اسکوربات پراکسیداز، گلوتاتیون ترانسفراز و پراکسیداز محلول نیز با بالا رفتن غلظت آنتراسن، افزایش یافت. همچنین افزایش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز، در نتیجه تولید ترکیبات فنولی در گیاه بوده است. از طرفی شاخص پرواکسیداسیون لیپیدهای غشایی در تحقیق حاضر کاهش معنی‌دار در ساقه داشته که نشان دهنده‌ی مقابله‌ی آنتی اکسیدانی گیاه با پرواکسیداسیون لیپید می‌باشد ولی به علت تجمع این ماده آنتراسن در ریشه، سرانجام لیز شدن و سستی در بافت ریشه ایجاد شده قدرت مقابله با این هیدروکربن را از دست می‌دهد.

### کلیدواژگان

*Medicago sativa* L.، تنش اکسیداتیو، سمیت آنتراسن، محیط هیدرو پونیک.



## مقدمه

در کشت‌های سلولی گونه‌های گیاهی مختلف، متابولیسم می‌شوند (Sander man et al., 1984). به دلیل آبگریزی بالای PAHs، عموماً تصور می‌شود که پیوند محکمی با ذرات خاک داشته باشند و به ندرت دسترسی زیستی دارند (Koolb et al., 2000)، اما برخی مطالعات نشان می‌دهند که گیاهان PAHs را از خاک جذب می‌کنند (Samson et al., 2002; Koochen et al., 2004). به هر حال ژن‌های گیاهی مسئول جذب، تجزیه و پیوند PAHs، عموماً ناشناخته هستند. مکانیسم‌های سمیت PAHs برای گیاهان، کمتر شناخته شده‌اند و سمیت گیاهی ظاهراً بسته به PAHs و گونه‌ی گیاهی خاص، متغیر است (Vayting et al., 2004; Bic et al., 2003). علاوه بر تجزیه و سم زدایی، دانش ملکولی درباره‌ی واکنش‌های تنشی و مکانیسم‌های دفاعی درگیر، به یافتن راه‌هایی برای حمایت از تحمل گیاهی نسبت به PAHs نیاز دارد. در حال حاضر، اینکه که تا چه حد مواجهه با PAHs، منجر به شروع مسیرهای سیگنال دهی تنش (مانند دیگر تنش‌های غیر زیستی و زیستی رایج در گیاهان) می‌شوند، و اینکه آیا ترکیبات سیگنال دهی مختص به تنش PAHs وجود داشته باشند یا خیر، روشن نیست (Alkio et al., 2005).

سمیت PAHs برای گیاهان رشد یافته در خاک نیز به شکلی گسترده مورد تحقیق و بررسی قرار گرفته است. مواجهه با میزان پایین PAHs می‌تواند رشد گیاه را تحریک کند، اما دوزهای بالای PAHs مانع و در نهایت مهارکننده رشد گیاهان است. علائم ریخت‌شناختی تنش PAHs، کاهش رشد ریشه و جوانه، کرک‌های گیاهی تغییر یافته، آغاز و رشد ناقص موهای ریشه، کلوروسیس، گل دهی دیررس و ظهور لکه‌های سفید رنگ هستند، در سطح بافت و سلول، گیاهان دچار تنش اکسیداتیو می‌شوند (zhenhua zhang et al., 2010). PAHs می‌توانند از طریق غشاهای سلولی، کاهش آب و استفاده کارآمد مواد مغذی و مهار فعالیت

در مورد هیدروکربن‌های چند حلقه ای (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: PAHs) به عنوان آلوده کننده‌های خطرناک و تولید کننده‌های تنش، مطالعات اندکی انجام شده است. PAHs از دو یا چند حلقه‌ی بنزن تشکیل شده که باعث مقاومت بسیار بالای این ملکولها در محیط زیست می‌شود. بسیاری از PAHs در محیط زیست، محصول جانبی تولیداتی با پایه‌ی نفت خام هستند. آنها در قیر ذغال سنگ، آسفالت، لاستیک اتومبیل و دیگر محصولات حاوی نفت وجود دارند و مثلاً از راه احتراق ناقص و ریزش قطرات نفت در محیط آزاد می‌شوند (کمیته ترمیم زیستی در محیط، ۱۹۹۳). PAHs در حیوانات، تأثیرات گسترده‌ای بر سلامتی دارند. آنها با DNA تعامل می‌کنند که نتیجه‌ی آن جهش‌ها و سرطان است (Harvi et al., ۱۹۹۱). در سلولهای جانوری، PAHs توسط اکسیدازها و ردوکتازها منتقل می‌شوند (Broshil et al., 2001; Zenaski et al., 1999). متابولیسم PAHs، متابولیت‌های الکتروفیلیک واکنشی را ایجاد می‌کند که ترکیبات سرطان زای واقعی هستند که باعث آسیب DNA می‌شوند (Vang et al., 2001). علاوه بر این PAHها، تولید گونه‌های اکسیژن واکنشی و مرگ سلولی در سلولهای جانوری را آغاز می‌کنند (Flaver et al., 1997; Boorsizeneski et al., 1999; Hiuora et al., 1999).

برخلاف میکروارگانسیم‌ها و حیوانات، درباره‌ی مکانیسم‌های سلولی و ملکولی، چگونگی جذب، واکنش و تجزیه‌ی PAHهای گیاهان، دانش اندکی وجود دارد (Kiit et al., 2002; Harvy et al., 2002). عموماً سم زدایی زنبیوتیک در گیاهان، مستلزم دگرگونی ترکیب مثلاً با گلوکز یا گلوکاتایون و تجزیه در واکنش دیواره‌ی سلولی است (Mac katchiuon et al., 2003). نشان داده شده که برخی از PAHs مانند بنز (آ)پیرن و فلورانتن



و شدت زیاد نور را نام برد. استرس اکسیداتیو همچنین در پاسخ به تنش شوری در گیاهان القا می‌شود. گیاه یونجه متعلق به نهاندانگان، علفی و چند ساله (parvaz 2006) از گروه Core Eudicots، زیر گروه Fabids، راسته Fabales، تیره Fabaceae و با نام علمی *Medicago sativa* L. می‌باشد (APG III). با توجه به ارزش اقتصادی و دارویی این گیاه، این پژوهش با هدف بررسی اثر غلظت‌های متفاوت آنتراسن بر القا تنش اکسیداتیو در گیاه و تأثیرات آن بر فرایندهای بیوشیمیایی در گیاه صورت گرفت.

### مواد و روش‌ها

بذر گیاه یونجه همدانی توسط آب ژاول و دترجنت ضد عفونی سطحی و سپس با آب مقطر شستشو داده شدند. سپس بذرها در ظروف پتری دیشی که از نقاط بالا و پائین توسط کاغذ صافی پوشانده شده بود، کشت داده شد. پس از هفت روز دانه رست‌های حاصل، به مدت 24 روز به منظور سازگاری در شرایط کشت هیدروپونیک قرار گرفتند و در نهایت رشد و نمو گیاه تحت این شرایط کامل شد. دمای محیط کشت در حدود  $27 \pm 3$  درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. هر گروه دارای 5 گلدان (تکرار) و هر گلدان حاوی 10 گیاه بود. محیط‌های کشت هر 5 روز یک بار تعویض می‌شدند و هر روز به میزانی که گیاه از محیط مصرف کرده بود به سطح ظرف اضافه می‌شد. هوادهی محیط با پمپ هوا انجام شد. محلول غذایی تغییر یافته هوگلند (1/2) دارای عناصر پرمصرف و کم مصرف به شرح زیر در (pH=6) می‌باشند:

(مقادیر بر حسب میلی مول):

Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. 4H<sub>2</sub>O: 2/5; KNO<sub>3</sub>: 2/5; MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O: 1; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 0/5

(مقادیر بر حسب ppm):

Fe-EDTA: 3; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>: 0/5; Mn (MnCl<sub>2</sub>. ): 0/5; Zn (ZnCl<sub>2</sub>): 0/05

Cu (CuCl<sub>2</sub>. 2H<sub>2</sub>O): 0/02; Mo (Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>): 0/02

فتوسنتز و انتقال الکترون نفوذ می‌کند. مهار فتوسنتز، غالباً مکانیسم کلیدی عمل مسموم کننده در گیاهان است. کارهای مقدماتی در مورد PAHs نشان می‌دهد که فتوسنتز و در غلظتهای پایین تر تنفس و آسیب عمومی غشا را باعث می‌شود. در سطح کل گیاه، نتیجه آن می‌تواند رشد معیوب گیاه، محصول کمتر و از دست دادن منافع رقابتی در میدان باشد ( zhenhua zhang et al., 2010). نمونه‌های این هیدروکربن‌ها، نفتالین، فنانتین، بنز (آ) آنتراسن، و بنز (آ) پیرن است (Harvi et al., 1991). آنتراسن نوعی PAH، با فرمول C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>، وزن ملکولی ۱۷۸.۲۳، نقطه ذوب ۲۱۶ درجه سانتیگراد می‌باشد (Sims et al., 1983) و بسته به نوع گونه و سن گیاه و مقدار غلظت آنتراسن در خاک، تغییراتی در ساقه و طول ریشه، بیوماس و ماده خشک و همچنین برگهای بدست آمده و تشکیل گره‌ها در طول زندگی گیاه ایجاد می‌کند. همچنین کاهش در تعداد گره‌ها، همراه با افزایش تعداد ریشه‌های جانبی اولین پاسخ گیاه به این تنش است. وجود محتوی ۱۰۰ برابر بیشتر آنتراسن در ریشه گیاه نسبت به ساقه و اندام‌های هوایی نشانگر ممانعت گیاه در برابر حمل و نقل آنتراسن است، به طوری که این ماده به طور عمده در بخشهای زیر زمینی ذخیره می‌شود تا در بذر و میوه گیاه که اندامهای مهم تجاری در کشاورزی هستند (Baldyga, et al., 2005).

هر شرایطی که در حفظ هومئوستازی سلول اختلال ایجاد کند منجر به تنش اکسیداتیو یا تولید Reactive oxygen species (ROS) می‌شود. تولید ROS در طی استرس محیطی یکی از دلایل اصلی کاهش محصول در گیاهان می‌باشد. از فاکتورهای محیطی که سبب تنش اکسیداتیو می‌شوند، می‌توان آلودگی هوا (افزایش مقدار ازن یا دی اکسید سولفور)، علف کش‌های اکسیدانت، فلزات سنگین، خشکی، گرما، سرما، زخم، اشعه UV، آلودگی‌های پاتوزن، پیری



## روش تیماردهی

بذرها به مدت ۱۲ روز با آنتراسن در غلظت‌های ۲ هزارم و ۴ هزارم مولار و استن به عنوان حلال، تیمار داده شدند. تعیین میزان غلظت آنتراسن و مدت زمان تیمار بر اساس نتایج تحقیقات قبلی و منابع موجود صورت گرفت (Dixit et al., 2011). پس از روز دوازدهم نمونه‌های شاهد و تیمار برداشت شدند. پس از شستشو با آب مقطر، ساقه و ریشه قلمه‌ها از محل یقه گیاه جدا گردید. نمونه‌ها با نیتروژن مایع منجمد شده و تا زمان انجام آنالیزهای بیوشیمیایی در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

## آنالیزهای بیوشیمیایی

کلیه آنالیزهای بیوشیمیایی در مورد آنزیم‌های سوپر اکسید دسموتاز، آسکوربات پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز و پراکسیداز و گلوکاتینون ترانسفراز و همچنین مالون دی آلدئید بر روی ساقه و ریشه به صورت جداگانه و کلروفیل در اندام هوایی انجام شد.

## اندازه گیری غلظت پروتئین کل به روش برادفورد

محلول‌های پروتئینی استاندارد با سرم آلبومین گاوی (BSA) در غلظت‌های ۰، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر تهیه شدند و به روش برادفورد، دانسیته نوری آنها در طول موج ۵۹۵ نانومتر تعیین شد و با تهیه منحنی استاندارد حاصل، محتوای پروتئین نمونه‌ها محاسبه گردید (Bradford, 1976).

۲ گرم وزن تر از اندام هوایی و ریشه به طور جداگانه، در ۳ میلی لیتر بافر  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -EDTA (Ph=۶/۱) حاوی ۰/۱ میلی مول ساییده و سپس با دور  $\times 12000$  g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد (تمام مراحل فوق در ۴ درجه سانتی گراد انجام شد). عصاره ی آنزیمی تهیه شده در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد برای انجام آزمایشات بعدی قرار داده شد.

## سنجش آنزیم سوپر اکسید دسموتاز (SOD)

سنجش فعالیت آنزیم سوپر اکسید دسموتاز (SOD) با روش فوتوشیمیایی (Cakmak and Horst, 1991) انجام شد. دانسیته نوری توسط اسپکتروفوتومتر مدل GBC cintra 6 ساخت استرالیا در ۵۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. یک واحد فعالیت SOD بر اساس مقدار آنزیم مورد نیاز برای مهار ۵۰% سرعت احیا NBT محاسبه شد.

## سنجش آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX)

بخش بر رو شناور حاصل، برای سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) با استفاده از روش Nakano (۱۹۸۱) مورد استفاده قرار گرفت. اکسیداسیون آسکوربات در طول موج ۲۹۰ نانومتر به مدت ۱ دقیقه سنجیده شد.

## سنجش آنزیم پراکسیداز محلول (SPO)

به منظور سنجش فعالیت پراکسیداز ۳ میلی لیتر مخلوط واکنش تهیه شد و سپس با افزودن به ۵۰ میلی مول عصاره آنزیمی دانسیته نوری آن در ۴۷۰ نانومتر به مدت ۱ دقیقه اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم بر حسب تغییرات جذب به نسبت mg پروتئین عصاره بیان گردید (Kjalke et al., 1992).

## سنجش آنزیم پلی فنل اکسیداز (PPO)

۳ میلی لیتر مخلوط واکنش تهیه شد و فعالیت آنزیم بر حسب تغییرات جذب آن در ۴۱۰ نانومتر به مدت ۱ دقیقه به نسبت میلی گرم پروتئین عصاره بیان گردید (Kahn, 1975).

## سنجش آنزیم گلوکاتینون ترانسفراز (GST)

۳ میلی لیتر مخلوط واکنش تهیه و فعالیت آنزیم بر حسب تغییرات جذب آن در ۳۴۰ نانومتر به مدت ۳/۳۰ دقیقه به نسبت میلی گرم پروتئین عصاره بیان گردید (Kahn, 1975).



## سنجش میزان غلظت مالون دی آلدئید (MDA)

سنجش میزان غلظت مالون دی آلدئید بر اساس روش (De Vos et al., 1991) سنجیده شد. مالون دی آلدئید با تیوباریتوریک اسید (TBA) تشکیل کمپلکس رنگی می‌دهد که غلظت آن با دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری می‌شود. به ۱ میلی لیتر از بخش بر رو شناور حاصل، ۱ میلی لیتر تیوباریتوریک اسید ۰/۵ درصد افزوده شد. مخلوط حاصل در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت و بلافاصله در یخ سرد شد. دانسیته نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۳۲ نانومتر و ۶۰۰ نانومتر تعیین شد. میزان MDA با استفاده از ضریب جذب ثابت Mm-1 ۱۵۵cm-1 ε و تفاوت جذب در دو طول موج ذکر شده محاسبه شد.

## سنجش میزان کلروفیل

سنجش میزان کلروفیل برگ با روش (Dlementina, 2008) انجام شد. دانسیته نوری عصاره کلروفیل در طول موج‌های ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر خوانده شد (Heldrich, 1990). مقدار کلروفیل a و b نمونه‌ها مطابق معادله‌های زیر محاسبه گردید.

$$\text{کلروفیل a در هر گرم وزن تر نمونه} = [12/7(D663) - 2/69(D645)]V/1000 W$$

$$\text{کلروفیل b در هر گرم وزن تر نمونه} = [22/9(D645) - 4/68(D663)]V/1000 W$$

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

## آنالیزهای آماری

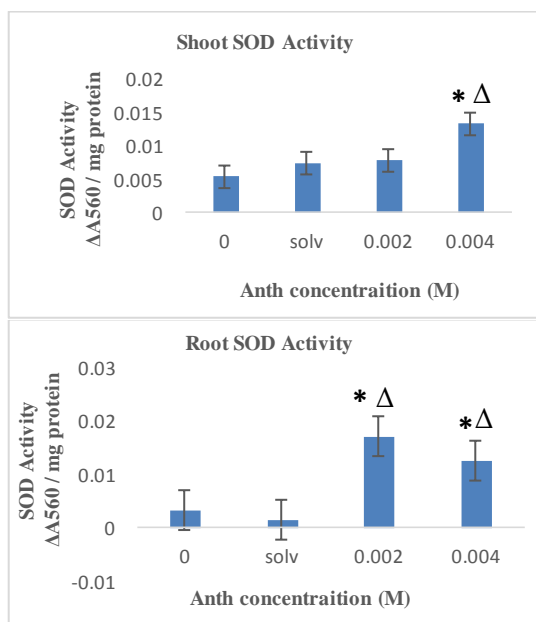
کلید آنالیزها با سه تکرار مستقل انجام گرفت و سپس نتایج به دست آمده از گروه‌ها به کمک نرم‌افزار

SPSS و مقایسه میانگین‌ها با آزمون 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  $p \leq 0.05$  بررسی شد.

## نتایج

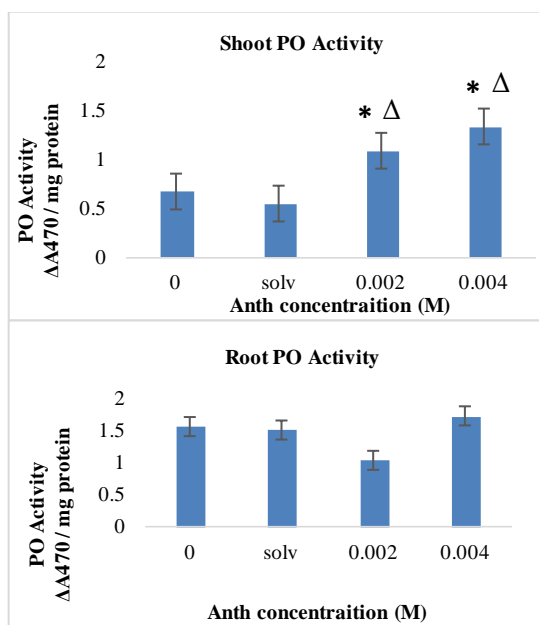
## میزان فعالیت آنزیم SOD در اندام هوایی و ریشه

نتایج حاصل از اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) در اندام هوایی و ریشه گیاه، نشان دهنده افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم SOD بود. در ساقه، روند افزایشی فعالیت آنزیم در تیمار با دوز ۴ میلی مولار آنتراسن در مقایسه با تیمار با دوز ۲ میلی مولار آنتراسن مشهودتر بود. این افزایش در سطح  $p \leq 0.05$  معنی‌دار بود (شکل ۱).



شکل ۱- فعالیت SOD در تیمار با دوزهای ۲ و ۴ میلی مولار آنتراسن نسبت به گروه کنترل در اندام هوایی و ریشه. داده‌ها میانگین ۵ تکرار و میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف معیار می‌باشد. معنی‌داری در  $p \leq 0.05$  در نظر گرفته شده است معنی‌داری گروه‌ها نسبت به شاهد با علامت \* و نسبت به حلال با علامت Δ نشان داده شده است. Solv: Solvent یا حلال استن.

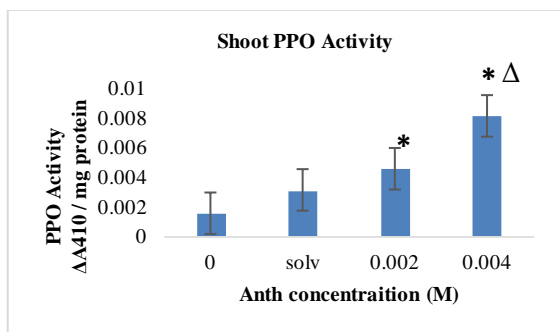




شکل ۳- فعالیت SPO در تیمار با دوزهای ۲ و ۴ میلی مولار آنتراسن نسبت به گروه کنترل در اندام هوایی و ریشه، داده‌ها میانگین ۵ تکرار و میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف معیار می‌باشد. معنی‌داری در  $p \leq 0.05$  در نظر گرفته شده است معنی‌داری گروه‌ها نسبت به شاهد با علامت \* و نسبت به حلال با علامت Δ نشان داده شده است

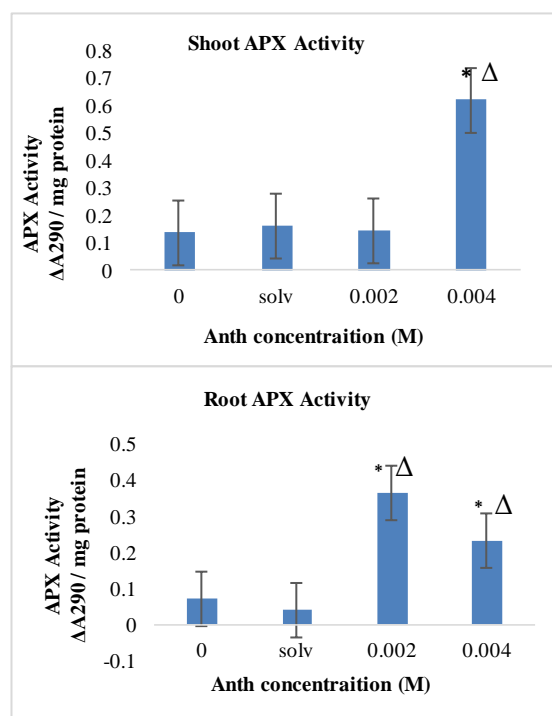
### میزان فعالیت آنزیم PPO در اندام هوایی و ریشه

نتایج حاصل از سنجش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز (PPO) در ساقه و ریشه نشان‌دهنده افزایش میزان فعالیت این آنزیم در گروه‌های تحت تیمار با آنتراسن نسبت به گروه شاهد و تیمار استن است، این افزایش فعالیت PPO در سطح  $p \leq 0.05$  معنی‌دار بود (شکل ۴).



### میزان فعالیت آنزیم APX در اندام هوایی و ریشه

با توجه به نتایج به دست آمده فعالیت آنزیم آسکورات پراکسیداز (APX) در اندام هوایی و ریشه گیاه یونجه در تیمار ۴ میلی مولار آنتراسن نسبت به شاهد و همچنین تیمار استن افزایش داشته است. این افزایش در سطح  $p \leq 0.05$  نیز معنی‌دار بود (شکل ۲).

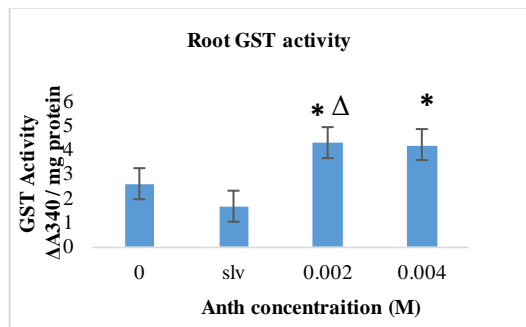


شکل ۲- فعالیت APX در تیمار با دوزهای ۲ و ۴ میلی مولار آنتراسن نسبت به گروه کنترل در اندام هوایی و ریشه، داده‌ها میانگین ۵ تکرار و میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف معیار می‌باشد. معنی‌داری در  $p \leq 0.05$  در نظر گرفته شده است معنی‌داری گروه‌ها نسبت به شاهد با علامت \* و نسبت به حلال با علامت Δ نشان داده شده است.

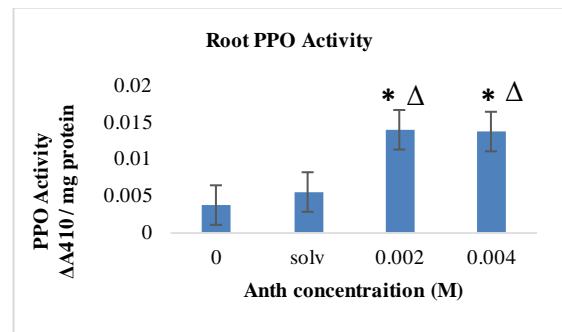
### میزان فعالیت آنزیم SPO در اندام هوایی و ریشه

میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز محلول (SPO) در ساقه و ریشه در گروه‌های تحت تیمار با آنتراسن نسبت به گیاهان شاهد و تیمار استن افزایش یافته است که این افزایش در سطح  $p \leq 0.05$  معنی‌دار بود (شکل ۳).





شکل ۵- فعالیت GST در تیمار با دوزهای ۲ و ۴ میلی مولار آنتراسن نسبت به گروه کنترل در اندام هوایی و ریشه، داده‌ها میانگین ۵ تکرار و میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف معیار می‌باشد. معنی‌داری در  $p \leq 0.05$  در نظر گرفته شده است معنی‌داری گروه‌ها نسبت به شاهد با علامت \* و نسبت به حلال با علامت  $\Delta$  نشان داده شده است.

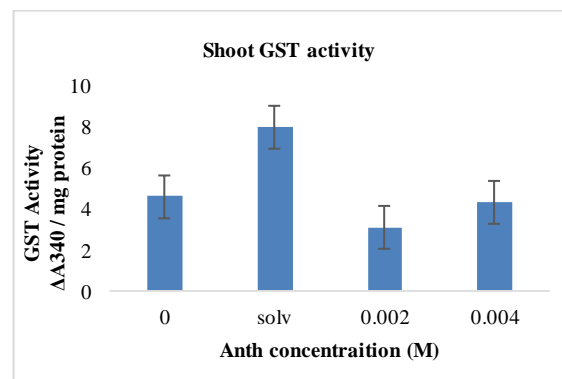
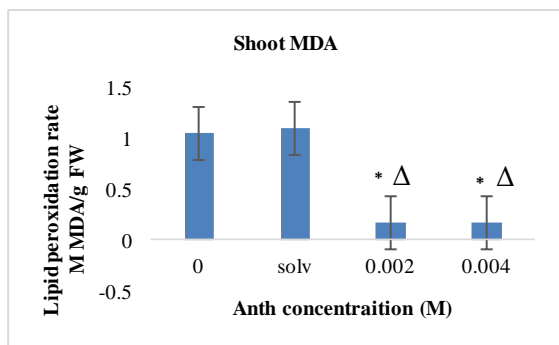


شکل ۶- فعالیت PPO در تیمار با دوزهای ۲ و ۴ میلی مولار آنتراسن و نسبت به گروه کنترل در اندام هوایی و ریشه، داده‌ها میانگین ۵ تکرار و میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف معیار می‌باشد. معنی‌داری در  $p \leq 0.05$  در نظر گرفته شده است معنی‌داری گروه‌ها نسبت به شاهد با علامت \* و نسبت به حلال با علامت  $\Delta$  نشان داده شده است.

### میزان فعالیت آنزیم GST در اندام هوایی و ریشه

نتایج حاصل از اندازه‌گیری گلوپروتئین ترانسفراز (GST) در اندام هوایی گیاه مدیکاگو ساتیوا نشان داد که تیمار آنتراسن بر میزان مالون دی آلدئید داشته و در مقایسه با گیاهان شاهد و تیمار استن، تیمار با دوزهای ۲ و ۴ میلی مولار آنتراسن سبب کاهش معنی‌دار فعالیت MDA گردید که این اختلاف در سطح  $p \leq 0.05$  معنی‌دار بود و برعکس در ریشه نتایج حاصل از اندازه‌گیری مالون دی آلدئید (MDA) نشان داد که تیمار آنتراسن بر میزان مالون دی آلدئید اثر مثبت داشته و در مقایسه با گیاهان شاهد و تیمار استن، تیمار با دوزهای ۲ و ۴ میلی مولار آنتراسن سبب افزایش معنی‌دار فعالیت MDA گردید که افزایش آن در سطح  $p \leq 0.05$  معنی‌دار بود (شکل ۶).

نتایج حاصل از اندازه‌گیری گلوپروتئین ترانسفراز (GST) در اندام هوایی گیاه مدیکاگو ساتیوا نشان داد که تیمار آنتراسن بر میزان گلوپروتئین ترانسفراز اثری نداشته و در مقایسه با گیاهان شاهد و تیمار استن، تیمار با دوزهای ۲ و ۴ میلی مولار آنتراسن سبب افزایش یا کاهش معنی‌دار فعالیت GST نگردیده است ولی نتایج حاصل از اندازه‌گیری گلوپروتئین ترانسفراز در ریشه گیاه مدیکاگو ساتیوا نشان داد که تیمار آنتراسن بر میزان گلوپروتئین ترانسفراز اثر مثبت داشته و در مقایسه با گیاهان شاهد و تیمار استن، تیمار با دوزهای ۲ و ۴ میلی مولار آنتراسن سبب افزایش معنی‌دار فعالیت GST گردید که این اختلاف در سطح  $p \leq 0.05$  معنی‌دار بود (شکل ۵).

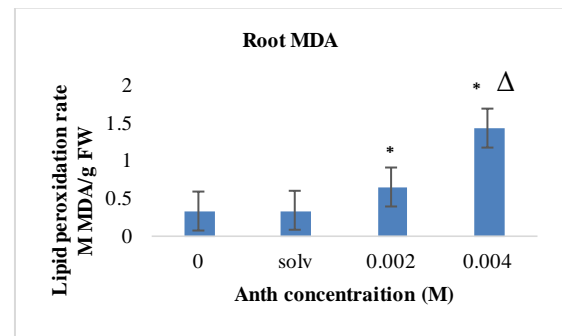


## بحث

## تأثیر آنتراسن بر سیستم آنتی اکسیدانت

در شرایط تنش، تولیدگونه های فعال اکسیژن (ROS) نظیر (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)، (OH·) و (O<sub>2</sub>·-) در میتوکندری و کلروپلاست قطعی است. با افزایش این ترکیبات به عنوان پیامبر ثانویه مسیر علامت رسانی در گیاه ایجاد می شود. به دنبال تغییرات فوق آنزیم های متابولیکی حساس و نیز ترکیبات غیر آنزیمی در جهت تعدیل اثرات تنش فعالیت می کنند. ROS به نوکلئوتیدها، پروتئین ها، کربوهیدراتها و اسیدهای چرب حمله می کنند. گیاهان مکانیسم هایی را برای از بین بردن این ترکیبات به خدمت می گیرند مانند آنزیم های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POD)، اسکورات پراکسیداز (APX) و گلوکاتیون ترنسفراز (GST) (Ghanati et al., 2009). گزارشات متعدد نیز نقش فلزات سنگین مانند آلومینیوم را در تولید گونه های فعال اکسیژن مولکولی و ایجاد استرس کنند اکسیداتیو تایید می کنند (Devi et al., 2003).

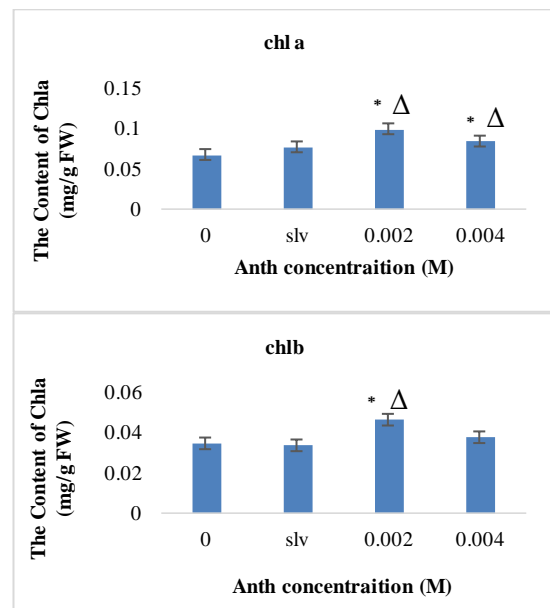
مهم ترین و اولین آنزیم آنتی اکسیدان در تمام ارگانایسم های هوای سوپر اکسید دیسموتاز SOD می باشد که در کاهش مستقیم متابولیت های اکسیژن فعال نقش دارند. این آنزیم به عنوان آنتی کارسینوژن عمل کرده و مانع شروع و تبدیل مراحل کارسینوژن می شود (Cunningham et al., 1984). سوپر اکسید یکی از اصلی ترین گونه های اکسیژن فعال در سلول است، SOD می تواند باعث تبدیل رادیکال سوپر اکسید به هیدروژن پراکسید شود (McCord and Fridovich, 1969). نقش اصلی حفاظت در مقابل (ROS) بر عهده آنزیم سوپراکسید دیسموتاز می باشد (Ghanati et al., 2005). این آنزیم اولین سد دفاعی را تشکیل می دهد که رادیکال های سوپر اکسید را به پروکسید هیدروژن تبدیل می کند. سپس پراکسید هیدروژن می تواند



شکل ۶- فعالیت MDA در تیمار با دوزهای ۲ و ۴ میلی مولار آنتراسن نسبت به گروه کنترل در اندام هوایی وریشه، داده ها میانگین ۵ تکرار و میله های عمودی نشان دهنده انحراف معیار می باشد. معنی داری در  $p \leq 0.05$  در نظر گرفته شده است معنی داری گروه ها نسبت به شاهد با علامت \* و نسبت به حلال با علامت  $\Delta$  نشان داده شده است.

## میزان کلروفیل هوا

مقادیر حاصل از سنجش محتوای کلروفیل a و b در گیاهان شاهد در مقایسه با گیاهان تیمار شده با آنتراسن افزایش معنی دار میزان کلروفیل a را در گیاهانی نشان داد که با دوز ۲ و ۴ میلی مولار آنتراسن تیمار شده بودند. این افزایش از نظر آماری در سطح 0.05  $p \leq$  نسبت به شاهد تیمار استن معنی دار بود (شکل ۷)



شکل ۷- فعالیت کلروفیل هوا در تیمار با دوزهای ۲ و ۴ میلی مولار آنتراسن نسبت به گروه کنترل، داده ها میانگین ۵ تکرار و میله های عمودی نشان دهنده انحراف معیار می باشد. معنی داری در  $p \leq 0.05$  در نظر گرفته شده است معنی داری گروه ها نسبت به شاهد با علامت \* و نسبت به حلال با علامت  $\Delta$  نشان داده شده است.





نسبت به بخش هوایی قابل توجه است. با توجه به اثرات مضر پراکسید هیدروژن به عنوان محصول واکنش فوق، تبدیل این ترکیب در مراحل بعدی ضروری می‌باشد. در گیاهان این واکنش با فعالیت CAT، APX، PO و تبدیل  $H_2O_2$  به  $H_2O$  کاتالیز می‌شود. در این میان APX تمایل زیادی به  $H_2O_2$  دارد و غلظت های کم آن را در اندامک های سلولی مختلف که در جریان فعالیت کاتالاز حذف نشده است جاروب می‌کند، Ghanati et al. (2005). اسید آسکوربیک یک مولکول کوچک فراوان در گیاهان و یک ماده کلیدی در شبکه آنتی اکسیدانی شامل آسکوربات، گلوکاتینون، آلفا-توکوفرول و یکسری از آنزیم‌های آنتی اکسیدان است. همچنین نشان داده شده است که اسید آسکوربیک نقش‌های متعددی در رشد گیاه از جمله تقسیم سلولی، گسترش دیواره سلولی و سایر پدیده‌های رشدی دارد (Pignocchi and Foyer, 2003; Conklin, 2001). آنزیم Apx پراکسید هیدروژن را در کلروپلاست، سیتوسل، میتوکندری و پراکسی زوم سلول‌های گیاهی به آب تبدیل می‌کند و پتانسیل هیدروژن لازم را از آسکوربات احیا می‌کند (Foyer and Nector, 2005). آسکوربات پراکسیداز در واکنش آسکوربیک اسید با پراکسید هیدروژن به ترتیب سبب تشکیل اسید مونوهدیدروآسکوربات و دهیدروآسکوربات می‌شود که این ترکیبات توسط مونو دهیدرو آسکوربات ردوکتاز و دهیدروآسکوربات ردوکتاز، احیاء یا  $NAD(P)H$  به اسید آسکوربیک تبدیل می‌شود. قناتی و نعمتی در سال ۱۳۸۹ افزایش APX در ریشه گیاه لیسینیوس (*Eustoma grandiflora*) تحت تیمار آلومینیوم را گزارش کردند.

افزایش معنی دار فعالیت APX در ساقه در تیمار ۴ میلی مولار آنتراسن بیانگر این است که فعالیت آنزیم کاتالاز در این غلظت پاسخ‌گوی نیاز گیاه به حذف  $H_2O_2$  نبوده و گیاه برای افزایش قدرت سازگاری خود تولید آنزیم APX را افزایش می‌دهد تا با کاهش

توسط آنزیم آسکوربات پراکسیداز در سیکل آسکوربات - گلوکاتینون 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; Chen et al., 2003).

بر طبق مطالعات Sharma and Dubey در سال ۲۰۰۵ و Garnczarska and Ratajczak در سال ۲۰۰۰ در تحقیقات خود افزایش فعالیت آنزیم SOD تحت سطوح سمیت سرب در دوزهای پائین را گزارش کرده‌اند. همچنین Naser و همکارانش در سال ۲۰۱۲ افزایش میزان SOD تحت تیمار کادمیوم در گندم را گزارش کردند. بنابراین به نظر می‌رسد که احتمالاً تولید و فعالیت بیشتر این آنزیم با کاهش دوز فلز سرب مکانیسم دفاعی مهمی در برابر این عناصر است که به استراتژی گیاه و مقاومت گیاهی نسبت داده می‌شود، به طوری که این آنزیم احتمالاً باعث هضم رادیکال سوپراکسید شده است.

در واقع احتمال دارد که این آنزیم با افزایش ترشح در گیاه مورد مطالعه به عنوان یک سیستم دفاعی در مقابل انواع واکنش‌گرهای اکسیژن عمل کرده باشد (Boojar et al., 2007).

در تحقیق حاضر افزایش معنی دار فعالیت این آنزیم در ساقه گیاهان تیمار شده با آنتراسن در غلظت ۴ میلی مولارگویای افزایش میزان  $(-O_2)$  در این غلظت است که با واکنش دیسموتا سیون SOD به پراکسید هیدروژن و اکسیژن تبدیل شده است. همچنین با افزایش غلظت تیمار، روند افزایش فعالیت این آنزیم معنی دار شد که این مساله با افزایش غلظت تیمار با آنتراسن و در نتیجه افزایش سطح تولید رادیکال سوپراکسید قابل توجه است. در حالی که در ریشه گیاهان تحت تیمار شروع این افزایش معنی دار را ما از غلظت ۲ میلی مولار شاهد هستیم که با توجه به تجمع بیشتر رادیکال سوپر اکسید در واکوئل‌های ریشه گیاه



فعالیت آنزیم پراکسیداز صورت گرفته است، چنانچه (۱۹۹۷) افزایش غلظت روی را در لوبیا بررسی کرد و مشاهده نمود که فعالیت این آنزیم با افزایش سولفات روی در اندام هوایی افزایش می‌یابد.

هم چنین Prasad and Strzalka (2002)، در گیاه خردل هندی تحت تیمار روی و Erdei (2002) در جو فعالیت آنزیم پراکسیداز در اندام هوایی به علت تولید  $H_2O_2$  ناشی از تیمار روی دارای افزایش، اما در ریشه حالت عکس داشته و با افزایش روی فعالیت آنزیم پراکسیداز در ریشه کاهش داشته است. به طور کلی بخش محلول پراکسیداز (SPO) که از گایاکول به عنوان انتقال الکترون استفاده می‌کند، در پاسخ‌های گیاه به شرایط تنش نقش دارد (Peng and Kuc, 1992).

در تحقیق حاضر افزایش معنی دار فعالیت آنزیم SPO در ساقه در تیمار آنتراسن با افزایش فعالیت SOD و APX در جهت کاهش میزان  $H_2O_2$  و سازگاری گیاه با تنش اکسیداتیو هماهنگ می‌باشد. در حالی که با افزایش غلظت آنتراسن در تیمارها فعالیت این آنزیم در سیستم ریشه ای گیاه تفاوت معنی داری نشان نمی‌دهد، بنابراین، این آنزیم در بخش فتوسنتز کننده نقش تعدیل شرایط تنش را دارد.

فلاونوئید در سیتوپلاسم و نیز سطح سیتوپلاسمی شبکه آندوپلاسمی سنتز می‌شوند و با فعالیت آنتی اکسیدانی در برابر تنش های زیستی و غیر زیستی نقش حفاظتی دارند. اکسیداسیون فلاونوئیدها (بوژه O-دی فنلها) در شرایط تنش سبب تولید ترکیبات جاروب کننده  $H_2O_2$  مانند سمی کوئینون‌ها و کوئینون‌ها می‌گردد. این واکنش در گیاهان با پلی فنل اکسیدازها (لاکازها و کاتکول اکسیدازها) و پراکسیدازها کاتالیز می‌شود (et al. Pourcel 2006).

آنزیم پلی فنل اکسیداز (PPO) با ورود به سیتوزول بافت های گیاهی آسیب دیده (آسیب مکانیکی) و ترکیب با مولکول اکسیژن واکنش اکسیداسیون

میزان  $H_2O_2$  قادر به سازگاری با شرایط تنش شود. همچنین افزایش فعالیت این آنزیم در تیمار با غلظت ۴ میلی مولار آنتراسن آغاز شده که با توجه به افزایش فعالیت SOD نیز در این غلظت و تولید بیشتر پراکسید هیدروژن توجیه پذیر است، زیرا حرکت این آنزیم در کاهش میزان  $H_2O_2$  در پاسخ به حرکت اولیه SOD افزایش تولید  $H_2O_2$  می‌باشد.

در حالی که در ریشه گیاه شروع افزایش معنی دار آنزیم APX برای حذف  $H_2O_2$  تولید شده توسط SOD در غلظت ۲ میلی مولار آنتراسن اتفاق می‌افتد و بعد از این افزایش معنی دار با افزایش غلظت آنتراسن میزان فعالیت هر دو این آنزیمها (زیرا حرکت این آنزیمها به موازات هم است) کاهش می‌یابد، احتمالاً با افزایش غلظت آنتراسن نقش عایق پوش کردن (حرکت مکانیکی) این ماده باعث کاهش عکس العمل گیاه در افزایش فعالیت (حرکت شیمیایی) این آنزیمها می‌شود. بخش محلول پراکسیداز (SPO) که از گایاکول به عنوان دهنده الکترون استفاده می‌کند، در پاسخ های گیاه به شرایط تنش نقش دارد (Pandolfini et al., 1992). آنها گروه بزرگ دیگری از آنزیمهای دفاعی هستند که در گیاهان در پاسخ به تنش های زیستی و غیرزیستی تولید می‌شوند. پراکسیدازها معمولاً واکنش اکسیداسیون و احیا را بین پراکسید هیدروژن به عنوان گیرنده الکترون و انواع زیادی از سوپراکسیدازها مثل ترکیبات فنلی، اسید اسکوربیک، آمین های آروماتیک و سیتوکروم C کاتالیز می‌کنند و به عنوان آنزیمهای سم زدایی گونه های اکسیژن واکنش گر عمل می‌کنند. آنزیم پراکسیداز 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). پژوهش های زیادی در مورد اثر فلز سنگین روی بر



ترکیبات فنلی به O-کوئینون‌ها را کاتالیز می‌کند. همچنین آئوریدین سنتاز (پلی فنل اکسیداز) واکنش اکسیداتیو تبدیل چالکون‌ها به آرون‌ها (گروهی از فلاونوئید های گیاهی) را در واکنش کاتالیز می‌کند (Ono et al., 2006). البته، هم شرایط رشد (مانند بروز شرایط تنش) و هم نوع ژنوتیپ بر فعالیت پلی فنل اکسیداز اثر می‌گذارد. پلی فنل اکسیداز یا تیروزیناز آنزیمی دارای دو اتم مس در هسته مرکزی خود می‌باشد و اکسیداسیون دی فنل‌ها به کینون‌ها را انجام می‌دهد. این آنزیم در این واکنش از اکسیژن مولکولی به عنوان سوپسترا استفاده می‌نماید (Winkel-Shirley, 2002; Mayer, 2006). مطالعه دولت‌آبادیان در سال ۱۳۸۷ افزایش PPO روی جوانه‌زنی بذر گندم *Triticum aestivum* تحت تنش شوری و حضور سالیسیلیک اسید گزارش کردند. با افزایش فعالیت آنزیم های سیستم آنتی اکسیدان در ریشه و تعدیل شرایط تنش در غلظت ۲ میلی مولار آنتراسن با افزایش بیشتر غلظت آنتراسن فعالیت ppo افزایش نمی‌یابد که این نشان دهنده قدرت سازگاری ریشه گیاه با تنش تا حدی از آلودگی می‌باشد و احتمالاً آسیب مکانیکی به ریشه که در تماس مستقیم با آنتراسن است باعث کاهش فعالیت آنزیم می‌شود. ولی در ساقه با افزایش غلظت آنتراسن (۴ میلی مولار) در نتیجه تولید بیشتر ترکیبات فنلی نظیر فلاونوئیدها فعالیت این آنزیم تازه افزایش معنی دار نشان می‌دهد.

با افزایش معنی دار فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان در ریشه گیاه تحت تیمار با آنتراسن، گونه های فعال اکسیژن (ROS) حاصل از تنش آنتراسن به طور موثری کاهش یافته و سبب سازگاری گیاه با تنش شده است. در دنباله این امر کاهش میزان پراکسیداسیون لیپیدی در ریشه بیانگر کاهش آسیب به غشاهای، کاهش سمیت آنتراسن و در نتیجه کمک به رشد گیاه می‌باشد. آنزیم گلوکاتایون ترانسفراز (GST) قادر است، کونژوگاسیون چندین دسته از مواد

الکتروفیل را با گلوکاتایون انجام دهد. این آنزیم در واکنش‌های بسیار حساس شرکت کرده و آرگانیزم‌ها را در مقابل بسیاری از اثرات مخرب الکتروفیل‌ها و پراکسیدها محافظت می‌کند. این آنزیم عامل مفیدی در از بین بردن هیدروکربن‌های چند حلقه ای است (Dixit et al., 2011; paskova et al., 2006).

میزان GST در ریشه گیاهان تحت تیمار مانند سایر آنزیم‌های آنتی اکسیدان (SOD, APX, PO, PPO, MAD) در غلظت ۲ میلی مولار آنتراسن شروع به افزایش معنی دار می‌کند ولی با افزایش غلظت آنتراسن تا حد ۴ میلی مولار میزان GST افزایش پیدا نمی‌کند ولی باز هم میزان آن نسبت به شاهد اختلاف معنی دار دارد و نشان دهنده مقابله گیاه در برابر رادیکال‌های اکسیژن مولکولی با افزایش تولید آنزیم است. مالون دی آلدهید یک محصول سمی سلولی ناشی از پروکسیداسیون چربی‌ها و نشان‌دهنده میزان تولید رادیکال‌های آزاد و بافت‌های تخریب شده است (Ohkawa et al., 1979). میزان مارکرزیستی مالون دی آلدهید در بافت گیاهی معیاری برای تعیین وضعیت پرو اکسیداسیون چربی‌ها است. پرو اکسیداسیون چربی‌ها در ارتباط با تولید سوپر اکسید می‌باشد. مثلاً، وجود مقادیر بالای فلزات سنگین در گیاه باعث افزایش تولید سوپر اکسید می‌شود. بنابراین، افزایش میزان بیومارکر مالون دی آلدهید نشان دهنده آن است که یون‌های فلزی توانسته‌اند باعث تحرکی ظرفیت تولید رادیکال‌های آزاد در گیاهان عالی شوند (Luna et al., 1994). برخی از یون‌ها با ویژگی‌های شدید ردوکس مانند مس و شاید حتی یون‌هایی که فاقد این ویژگی‌ها هستند مانند روی و کادمیوم به عنوان آغازکننده‌های پراکسیداسیون لیپید غشا و تحریک کننده‌های تولید گونه‌های فعال اکسیژن شناخته شده‌اند. پراکسیداسیون لیپید به دلیل فعالیت لیپوکسی ژنازها افزایش می‌یابد، مالون دی آلدهید (MDA) فراوان‌ترین محصول حاصل از تجزیه لیپید آلدهیدی به شمار می‌آید (Davey et al.,



جایگزینی یون‌هایی مانند منیزیم و منگنز و غیره با سرب در کلروپلاست و ممانعت از ساختن یا تجزیه رنگیزه‌های فتوسنتزی القاء کند. سمیت فلزات سنگین همچنین تنش اکسیداتیو را از طریق تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن شامل رادیکال‌های سوپراکسید، رادیکال‌های هیدروکسیل و هیدروژن پراکسید القاء می‌کند (Reddy et al., 2005).

در بررسی‌های حاضر محتوای کلروفیل a و b در اندام هوایی پس از تیمار آنتراسن افزایش معنی‌داری یافت. این تغییر با افزایش کارایی سیستم دفاعی گیاه و تاخیر فرآیند پیری هم‌راستا است به طوری که با افزایش میزان غلظت آنتراسن از ۲ به ۴ میلی‌مولار، میزان کلروفیل a و b در بخش هوایی افزایش می‌یابد. Flocco ظرفیت کلی کلروفیل (chl a, chl b) برگ‌های یونجه ایی که در معرض فنان‌ترین قرار گرفته‌اند را سنجیده بود و در آخر آزمایش، تفاوت‌های چشمگیری در سطوح chl a بین گیاهان در معرض فنان‌ترین و گیاهان کنترل پیدا نکرده بود. می‌توان گفت: افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های سیستم آنتی‌اکسیدان و نیز ترکیبات آنتی‌اکسیدان سبب حمایت فرآیند‌های متابولیسم در برابر اثرات سمی آنتراسن می‌شود. Flocco بیان کرده است که آنزیم‌های گیاهی خانواده Fabaceae با داشتن P450 توانایی اکسیده کردن ترکیبات آروماتیک چند حلقه ایی را دارند و این آنزیم‌ها راه اصلی برای دفع مسمومیت این ترکیبات می‌باشند. همچنین او در مقاله خود، یک قانون برای بیان آنزیم پروکسیداز ارائه کرده است: سطح و الگو ایزو آنزیمی پروکسیداز را میتوان از طریق فشارهای محیطی تغییر داد و این آنزیم اغلب به عنوان نشانه‌ای زیستی نامشخص آلودگی محیطی، استفاده میشود و یک همبستگی مثبت بین میزان پروکسیداز بافت‌های گیاهی و بی‌کلرو فنیل (PCB) و PAHها گزارش کرده بود. با در نظر گرفتن نقش پروکسیدازها در سم‌زدایی PAHها یا فشار وارده در حضور آلاینده‌های ارگانیک، به

مطالعه قناتی و نعمتی در سال ۱۳۸۹ تحت تأثیر عنصر آلومینیوم در ریشه گیاه لیسینتوس به دنبال افزایش کاتالاز و کاهش H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> و در نتیجه کاهش آسیب به غشای پلاسمایی کاهش مالون دی‌آلدئید را گزارش کرده‌اند (قناتی و نعمتی، ۱۳۸۹). با اعمال تیمار آنتراسن در بخش هوایی میزان MDA کاهش پیدا کرده است که در هردو غلظت تیمار آنتراسن این اختلاف نسبت به گروه شاهد معنی‌داری باشد. که این نتایج نشان‌دهنده سازگاری بخش فتوسنتز کننده گیاه با شرایط تنش و غلبه گیاه بر رادیکال‌های آزاد می‌باشد. شاید بتوان گفت: این نتایج موید این مطلب است که سیستم آنتی‌اکسیدانی بخش هوایی گیاه مدیکاگو ساتیوا توانایی از بین بردن رادیکال‌های آزاد را در حضور تیمار آنتراسن داشته و مانع از خسارت اکسیداتیو به گیاه می‌شود. در حالی که تجمع بالای آنتراسن در ریشه گیاه و در نتیجه غلبه این هیدروکربن حلقوی بر سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه، پراکسیداسیون لیپید غشایی را به طور معنی‌داری در هردو تیمار آنتراسن افزایش داده است، به طوری که مطابق با شکل (۶) با اعمال تیمار آنتراسن در ریشه گیاه میزان MAD افزایش پیدا کرده است که این افزایش در هردو غلظت متفاوت تیمار آنتراسن نسبت به گروه شاهد معنی‌دار است. در نهایت پراکسیداسیون لیپید غشایی در ریشه گیاه با مختل کردن سیستم ریشه ایی باعث ضعیف شدن گیاه می‌شود.

### کلروفیل a و b

فتوسنتز یکی از حساس‌ترین فرآیندهای متابولیکی نسبت به سمیت فلزات سنگین است و مطالعات متعددی بازدارندگی فتوسنتز در گیاهان مختلف رشد یافته تحت تنش فلزات سنگین را گزارش کرده‌اند. فلزات سنگین کاهش فتوسنتز را ممکن است از طریق بازگشایی روزنه، آسیب به سازماندهی فراساختاری کلروپلاست، تغییر در متابولیت‌های فتوسنتزی،



بررسی فعالیت پروکسیداز ریشه‌های گیاهان یونجه در طول آزمایش دفع پرداخته شده است. Flocco et al., (2014).

### نتیجه‌گیری

با تأثیر آنتراسن با غلظت‌های ۲ و ۴ میلی مولار افزایش نسبی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان موجب کاهش تولید و تجمع گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر (ROS) شده که این آنزیم‌ها (SOD, PO, PPO, APX, GST) قادرند تنش اکسیداتیو را مهار کنند. با افزایش اثر آنزیم‌ها مخصوصاً در غلظت ۴ میلی مولار آنتراسن و از بین رفتن  $H_2O_2$ ‌های موجود در گیاه، شاخص پراکسیداسیون لیپید کاهش یافت. همچنین به دلیل تأثیر تنش آنتراسن میزان تولید کلروفیل افزایش یافت این تغییر با افزایش کارایی سیستم دفاعی گیاه و تاخیر فرآیند پیری هم راستا است. افزایش فعالیت

آنزیم‌ها در ساقه و ریشه به طور معنی‌دار در تیمار آنتراسن اتفاق می‌افتد و این روند افزایش به طور نسبتاً منظم در اندام هوایی در غلظت ۴ میلی مولار آنتراسن، و در ریشه در غلظت ۲ میلی مولار رخ می‌دهد. آنتراسن بیشتر در ریشه تجمع پیدا می‌کند و با تجمع در ریشه و تأثیر بیشتر بر پراکسیداسیون لیپید غشای سلولهای ریشه باعث تضعیف سیستم ریشه ای در گیاه مدیکاگو ساتیوا می‌شود. کاهش میزان MDA در قسمت هوایی و متعاقب آن افزایش میزان آن در ریشه دلیلی بر اثبات این مدعاست. با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان اذعان داشت گیاه *Medicago sativa* مانند بعضی از گیاهان دیگر این خانواده دارای توانایی نگهداری مواد شیمیایی در ریشه خود می‌باشد.



## منابع و مآخذ

۱. ابراهیمی، س. شایگان، ج. ملکوتی، م. اکبری، ع (۱۳۹۰) ارزیابی زیست محیطی و سنجش برخی شاخص‌های مهم آلودگی نفتی در اراضی محدوده پالایشگاه گاز سرخون بندر عباس. محیط شناسی. سال سی و هفتم. شماره ۵۷.
۲. امتیاز جو، م. صدیقی، س. امتیاز جو، م. (۱۳۸۸). اصلاح زیستی آنتراسن در حوزه آبی جزیره سیری خلیج فارس با رویکرد ایمنی زیستی. علوم و تکنولوژی محیط زیست. دوره یازدهم. شماره ۳.
۳. امینی، ا. دودی، م. طهمورث پور، آ. عبدلهی، آ (۱۳۹۲) جداسازی، شناسایی مولکولی و ارزیابی تجزیه زیست آنتراسن جدا شده از خاک پالایشگاه اصفهان. سال ششم، فصل سوم. شماره ۲۲۸-۲۳۶.
۴. امینی، ز. معلمی، ن. سعادت، ص. (۱۳۹۱). مقایسه اثر تنش کم آبی بر تغییرات میزان پرولین و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت در سه رقم زیتون (*Olea europaea L.*) مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست شناسی ایران). سال دوم، جلد ۲۷. شماره ۱۵۶-۱۶۷.
۵. بسالت پور، ع. حاج عباسی، م. درستکار، و. ترابی، غ (۱۳۸۹) اصلاح خاکهای آلوده به هیدروکربن‌های نفتی به روش ترکیبی زمین پالایی- گیاه پالایی. مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی. سال چهاردهم. شماره ۵۳.
۶. پاک، ع. (۱۳۹۰) لایروبی (راهنمای ارزیابی اثرات زیست محیطی) پژوهشکده حمل و نقل، جلد دوم. شماره ۱-۵۱۳.
۷. تاجیک، م. خامه چیان، م. چرخابی، ا. (۱۳۹۲) بررسی زمین زیست محیطی توزیع آلودگی‌های نفتی در رسوبات ساحلی. علوم و تکنولوژی محیط زیست. دوره پانزدهم، شماره ۳.
۸. چاپارزاده، ن.، زرنندی میاندوآب، ل. (۱۳۹۰). اثر شوری بر محتوای رنگدانه‌های و رشد دو رقم گیاه کلزا (*Brassica napus*). زیست شناسی گیاهی. سال سوم. شماره نهم. ۱۳ - ۲۶.
۹. خدا بخش، ا. جمیلی، ش. مطلبی، ع. مرادی، ع. ساروی، ح (۱۳۹۳). تأثیر فاز محلول نفت خام بر میزان تغییرات آنزیم‌های آنتی اکسیدانی در بچه فیل ماهی (*Huso huso*) به عنوان بیو مارکر آلودگی نفتی. نشریه توسعه آبی پروری. سال هشتم. شماره اول.
۱۰. دولت آبادیان، آ.، مدرس ثانوی، ع. م.، اعتمادی، ف. (۱۳۸۷). اثر پیش تیمار اسید سالیسیلیک بر جوانه‌زنی بذر گندم (*Triticum aestivum L.*) در شرایط تنش شوری. مجله زیست‌شناسی ایران. جلد ۲۱. شماره ۴. ۱۵ - ۲۶.
۱۱. شعبانی، ه. پیوست، غ. الفتی، ج. رضانی، پ. (۱۳۸۹). اثر کمپوست زباله شهری بر تجمع پیرن و آنتراسن بر میوه بادمجان. مجله علوم باغبانی ایران. دوره ۴۱. شماره ۶۲-۷۰.
۱۲. عسکری، م. نوری، م. امینی، ف. بیگی، ف. (۱۳۹۰) ارزیابی جوانه زنی، مقدار کلروفیل و رشد گیاه افاقیا (*Rubinia pseudoacacia L.*) زیست شناسی گیاهی، سال سوم. شماره ۷.
۱۳. قناتی، ف. نعمتی، ف. (۱۳۸۹). تأثیر مثبت آلومینیوم در فعال کردن سیستم آنتی اکسیدان ریشه‌های گیاه لیسیانوس (*Eustoma grandiflora L.*). مجله زیست‌شناسی گیاهی ایران. سال دوم. شماره دوم. (پیاپی ۴). ۴۱-۵۳.
۱۴. قناتی، ف. نعمتی، ف. (۱۳۸۹). تأثیر مثبت آلومینیوم در فعال کردن سیستم آنتی اکسیدان ریشه‌های گیاه لیسیانوس (*Eustoma grandiflora L.*) زیست شناسی گیاهی ایران. سال دوم. صفحه ۴۱-۵۳. شماره دوم.



۱۵. کوچکی، ع. عزیزاده، ا. (۱۳۷۴) اصول زراعت در مناطق خشک. صفحه ۴۱-۶۸، جلد دوم.
۱۶. مجد، ا. صفاری، پ. جنوبی، پ. مهراییان، ص. (۱۳۹۰) بررسی مراحل تکوینی بخش‌های رویشی و زایشی انگور شاهانی. فصلنامه علمی پژوهشی زیست‌شناسی تکوینی. سال سوم، شماره ۱۰.
۱۷. مللی، ا. افیونی، م. خوش‌گفتار منش، ا. حاج‌عباسی، م. (۱۳۹۰) گیاه پالایی هیدروکربن‌های نفتی لجن فاضلاب پالایشگاه اصفهان. سال پانزدهم. شماره ۵۶.
۱۸. موافقی، ع. (۱۳۹۱). مطالعه تکوینی فراساختار سلولهای کلاهک در ریشه نخود (*Pisum sativum L.*) زیست‌شناسی گیاهی، سال پنجم، شماره ۱۵، صفحه ۸۳-۹۴.
19. Adam G. and Duncan H. J. (1999) effect of diesel fuel on growth of selected plant species. *Environmental geochemistry and health*. 21: 353-357.
20. Ahmadi M., Alipour Z. T., Farrokhian firuzi A. (2013) Investigation of the possibility of phytoremediating a soil contaminated with Anthracene. *Journal of chemical health risks* 3(3):69-76.
21. Alkio M aromatic hydrocarbons in Arabidopsis include growth inhibition and hypersensitive response-like symptoms. *Journal of Experimental Botany*. 56. 421: 2983- 2994.
22. Baldyga B., Wiczorek J., Smoczynski S., Wieszorek Z., Smocynska K. (2005) Pea plant response to Anthracene present in soil. *Polish Journal of Environmental studies*. 14. 4: 397-401.
23. Bates, L. S., Weldren R. P., and Tear I. D. (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil*. 39: 205-207.
24. Brown, M. Wilson, R. Macnee, W. Stone, V. Donaldson, K. (2001). Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. *Toxicology and applied pharmacology*. 175:191-199.
25. Burrows, T. S. Boag, and W. P. (1992).. Changes in Leaf, Stem, and Root Anatomy of *Chrysanthemum cv.*, Wagga Wagga. Box 588- 2650
26. Cakmak I., Horst W. J. (1991) Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiol. Plant*. 83: 463-468.
27. Chartzoulakis, K. Patakas, A. Kofidis, A. Bosabalidis, A. (2002). Water stress affects leaf anatomy, gas exchange water relations and growth of two avocado cultivars. *Scientia Horticulturae*. 95 :39-50.
28. Clementina O. A., Olusola J. O., and Luqman S. K. (۲۰۰۸) Effect of spent engine oil on the growth parameters and chlorophyll content of *Corchorus olitorius*. L. *Journal of Environmentalist*. ۲۸: ۴۵۰-۴۴۶.
29. Collins, C. Fryer, M. Grosso, A. (2006). Plant Uptake of Non-Ionic Organic Chemicals. *Environ. Sci. Technol*. 40:45-52.
30. De Micco, V. Aronne, G. (2012). Morpho-Anatomical Traits for Plant Adaptation to Drought. V. De Micco. 10:1007-978. -
31. De Vos C. H. R., Schat H., De Waal M. A. D., Vooijs R., Ernst W. H. O. (۱۹۹۱). Increased resistance to copper-induced damage of root plasma membrane in copper tolerant *Cilene cucubalus*. *Physiol. Plant*, ۸۲: ۵۲۸-۵۲۳.
32. Dixit P., Mukherjee P. K., SHerkhane P. D., Kale S. P., Eapen S. (2011) Enhanced tolerance and remediation of Anthracene by transgenic Tobacco plants expressing a fungal glutathione transferase gene. *Journal of Hazardous materials*. 192: 270-276.
33. Eapen S., Singh S., Souza S. (2007) Advances in development of transgenic plants for remediation of xenobiotic pollutants. *Biotechnology Advances* 25:442-451.
34. Flocco C. G., Lobalbo A., Carranza M., Bassi M., Giulietti A. M. and Mak Cormack W. P. (2002) Some physiological, Microbial, and toxicological aspects of the removal of phenanthrene by hydroponic cultures of Alfalfa (*Medicago sativa L.*). *International Journal of Phytoremediation*. 4(3): 169- 186.



35. Fougere F., Rudulier D. and Streeter J. G. (1991) Effects of salt stress on amino acid. Organic acid and carbohydrate composition of roots, bacteroids and cytosol of alfalfa (*Medicago sativa* L. ). *Plant Physiol.* 96: 1236-1228.
36. Gao Y., Li H. and Gong S. (2012) Ascorbic acid enhances the accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in roots of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb. ). *PLoS ONE* 7(11): e50467. doi:10.1371/journal.pone.0050467.
37. Habig W. M., Pabst M. J., and Jakoby W. B. (1974) Glutathione-S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249:7130-7139.
38. Huseyindural, B. (2015). Morphology and anatomy of *Hedysarum pannosum*. *De gruyter open*. 10:1515-0009. (Boiss. ) Boiss. (Fabaceae)
39. Iiyama K. and Wallis A. F. A. (1990) Determination of lignin in herbaceous plants by an improved acetyl bromide procedure. *J. Sci. Food Agric.* 51: 145- 161.
40. Kacalkova L., Tlustos P. (2011) The uptake of persistent organic pollutant by plants. *Central European journal of Biologie.* 6(2):223-235.
41. Kahn V. (1975) Polyphenol oxidase activity and browning of three avocado varieties. *J. Sci. Food Agric.*, 51: 145-161.
42. Karamian, R. Behjou, A. Ranjbar, M. (2012). Anatomical findings of *Onobrychis sect. Heliobrychis* (Fabaceae) in Iran and their taxonomic implications. *Turk J Bot* 36: 27-37.
43. Li, Y. Gao, S. Wu, K. Cheung, X. Wong. (2008) PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL RESPONSES OF RICE (*ORYZA SATIVAL.* ) TO PHENANTHRENE AND PYRENE. *International Journal of Phytoremediation.* 10:106-118.
44. Lin D., Zhu L., He W., Tu Y. (2006) Tea plant uptake and translocation of polycyclic aromatic hydrocarbons from water and around air. *J. Agric. Food chem.* 54:36583662.
45. List, H. White, J. (2008). Plant hydraulic lift of soil water—implications for crop production and land restoration. *Plant Soil.* 313:1-17.
46. Liste H., Alexander M. (2000) Accumulation of phenanthrene and pyrene in rhizosphere soil. *Chemosphere.* 40. 11-14.
47. 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.
48. Masakazu H., Karin O., Hashino K. (2003) Enhancement of anthocyanin biosynthesis by sugar in radish (*Raphanus sativus*) hypocotyl. *164-2: 259-265.*
49. Mohan S. V., Kisa T., Ohkuma T., Kanaly R. A. and Shimizu Y. (2006). Bioremediation technologies for transment of PAH- contaminated soil and strategies to enhance process efficiency. *Rev Environ Sci Biotechnol.* 5: 347-374.
50. Negeswara Rao C. V., Afzal M., Malallah G., Kurian M., Gulshan S. (2007) Hydrocarbon uptake by roots of *Vicia faba* (Fabaceae). *Environ Monit Assess* 132:439-443
51. Newman, L. Reynolds, C. (2004). Phytodegradation of organic compounds. *Environmental biotechnology.* 15:225-230.
52. Pandolfini F., Gabbriellini R., and Comparini C. (1992) Nickel toxicity and peroxidase activity in seedlings of *Triticum aestivum* L. *Plant Cell Environ.* 15: 719-725.
53. Paskova V., Hilscherova K. Felmannova 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(12): 3238-3245.
54. Petersen L., Larsen E., Bruun P., (2002) Uptake of trace elements and PAHs by fruit and vegetables from contaminated soils. *Environ. sci. Technol.* 36:3057-3063





55. Pivets, B. (2001). Ground Water Issue. United States Environmental Protection Agency. 540:500.
56. Renault S., Zwiazek J. J., Fung M. and Tuttle S. (2000) Germination, growth and gas exchange of selected boreal forest seedlings in soil containing oil sands tailings. Environmental pollution. 107. 357-365.
57. Sabaii, T. Zarre, S. Podlech, D. (2007). Two new species of Astragalus sect. Anthylloidei (Fabaceae). Willdenowia 37:297-304.
58. Scheidemann p., Klunk C., Sens C., Werner D. (1997) Species dependent uptake and tolerance of nitroaromatic compounds by higher plants. Journal of plant physiology. 152:242-247.
59. Siahpoosh, A. Ghasemi, M. Majd, A. Rajabi, H. Nejadstari, T. (2015). Vegetative and reproductive anatomy of *Vigna radiata* L.. Tropical plant research. 2(1):23-29.
60. Smith M. J., Flowers. T. H., Duncan H. J., Alder J. (2006) Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on germination and subsequent growth of grasses and legumes in freshly contaminated soil and soil aged PAHS residues. Environmental pollution 141:519-525
61. University "Al. I. Cuza" Iasi, Department of Plant Science, 11 Carol I. Bdul. (2009). Air Pollution Effects on the Leaf Structure of some Fabaceae Species Irina Neta GOSTIN. Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj 37 (2) :57-63.
62. Wayne A. and Ronald C. S. (1990) Evaluation of the use of prairie grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbon treatment. Chemosphere. 20 (1-2). 253-265.
63. Wetzel, A. Alexander, S. Brandt, S. Haas, R. Werner, D. (1994) Reduction by fluoranthene of copper and lead accumulation in *Triticum aestivum* L. Bull. environ. contam. toxicol. 53:856-862.
64. Zare-maivan, H. (2011) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Plants of Shadegan Wetland: *Halocnemum strobilaceum* and *Suaeda maritime*. Journal of the Persian Gulf. 5:37-41.
65. Zhan, Z. Yuan, J. Yue, L. Xu, G. Hu, B. Xu, R. (2010). Accumulation of phenanthrene by root of intact wheat (*Triticum acstivum* L. ) seedlings: passive or active uptake? BMC Plant Biology. 10:52.
66. Zhan, Z. Yuan, J. Yue, L. Xu, G. Hu, B. Xu, R. (2014). Response of uptake and translocation of phenanthrene to nitrogen form in lettuce and wheat seedlings. Environ sci pollut res. 1007:1136-3843.
67. Zhang, Zh. Rengel, Z. Meney, K. (2010) Polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) differentially influence growth of various emergent wetland species. Journal of Hazardous Materials 182 :689-695.

