

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

لیلا جعفری^۱، مریم خوش سخن مظفر*^۱، الهه وطن خواه^۲

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

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

*m.khoshm@gmail.com

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 اکسیدانسی را به هم می‌زنند. برخی گیاهان دارای سیستم ریشه‌ای ارزشمندی هستند که می‌تواند ترکیبات آلی مانند هیدروکربن‌های آروماتیکی چند حلقه‌ای را دور کنند. در بین هیدروکربن‌های آروماتیکی، آنتراسن از سمی‌ترین و سرطان‌زا ترین ترکیباتی است که تاکنون، توسط آژانس محافظت از محیط زیست آمریکا شناخته شده است. این ماده در مراحل مختلف تکوینی و فیزیولوژیکی تاثیر می‌گذارد.

در این مطالعه هدف بررسی اثر غلظت‌های متفاوت آنتراسن بر القا تنش اکسیداتیو در گیاه یونجه می‌باشد. در ابتدا بذر ها در چهار گروه شاهد، حلال استن، تیمار ۲ و ۴ میلی مولار در ظروف پتری جوانه زدند. دانه رست ها 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 را نشان داد. این مساله همراستا با افزایش غلظت کلروفیل بود. افزایش میزان فعالیت آنزیم آنتی اکسیدانت سوپر اکسید دیسموتاز به منظور حذف رادیکال سوپراکسید ناشی از تیمار آنتراسن و افزایش فعالیت آنزیم های اسکوربات پراکسیداز، گلوکاتایون ترانسفراز و پراکسیداز محلول به دنبال افزایش غلظت آنتراسن و همراستا با افزایش آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز می‌باشد. همچنین افزایش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز، در نتیجه تولید ترکیبات فنولی در گیاه بوده است. از طرفی شاخص پراکسیداسیون لیپیدی غشایی در تحقیق حاضر کاهش معنی‌دار در ساقه داشته که نشان دهنده‌ی مقابله‌ی آنتی اکسیدانی گیاه با پراکسیداسیون لیپید

می‌باشد ولی افزایش معنی دار آن در ریشه نشان می‌دهد که با افزایش آنتراسن در ریشه (به علت تجمع این ماده سمی در ریشه)، گیاه سرانجام (لیز شدن و سستی بافت ریشه) قدرت مقابله با این هیدروکربن را از دست می‌دهد.

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

مقدمه

در مورد هیدروکربن‌های چند حلقه‌ای (PAHs) به عنوان آلوده کننده‌های خطرناک، به عنوان 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 درمورد 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 (Zenaski et al., ۱۹۹۹؛ Broshil et al., ۲۰۰۱). متابولیسم PAHs متابولیت‌های الکتروفیلیک و 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., ۱۹۹۷؛ Boorsizeneski et al., ۱۹۹۹؛ Hiuora et al., 1999).

برخلاف میکروارگانیسم‌ها و حیوانات، درباره‌ی مکانیسم‌های سلولی و ملکولی چگونگی جذب، واکنش و تجزیه‌ی PAH های گیاهان، دانش اندکی وجود دارد (Kiit et al., 2002; Harvy et al., 2002). عموماً سم‌زدایی زنبیوتیک در گیاهان، مستلزم دگرگونی ترکیب مثلاً با گلوکز یا گلوکاتینون 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 در کشت‌های سلولی گونه‌های گیاهی مختلف، متابولیزه می‌شوند (Sander man et al., 1984). به دلیل آبرگریزی 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; Kooohen 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., 2003; Bic et al., 2004). 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. PAHs می‌توانند از طریق غشاهای سلولی، کاهش آب و استفاده کارآمد مواد مغذی و مهار فعالیت 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 پایین‌تر 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 2010 et al.). نمونه‌های این هیدروکربن‌ها، نفتالین، فنانتین، بنز (آ)آنتراسن، و بنز(آ)پیرن است (Harvi et al., 1991). آنتراسن نوعی PAH با فرمول $C_{18}H_{12}$ ، 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 پاتوژن، پیری 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 ۲۰۰۶) 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 تاثیرات آن بر فرایند های 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 ۲۴ 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 3 ± 27 تنظیم شد. هر گروه دارای ۵ گلدان (تکرار) و هر گلدان حاوی ۱۰ گیاه بود. محیط‌های کشت هر ۵ 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 (۱/۲) دارای عناصر پرمصرف و کم مصرف به شرح زیر در (pH=۶) می‌باشند:

(مقادیر بر حسب میلی مول) :

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

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 گلوکاتایون 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

محلول های پروتئینی استاندارد با سرم آلبومین گاوی (BSA) در غلظت های ۰، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر تهیه شدند. به منظور سنجش محتوای پروتئین، به ۱۰۰ میکرولیتر از هر یک از محلول های استاندارد یا نمونه (اندام هوایی و ریشه گیاهان مورد مطالعه)، ۱ میلی لیتر معرف برادفورد (بلو کوماسی بریلیانت) افزوده و در ورتکس کاملاً مخلوط شد. نمونه ها به مدت دقیقه ۱ در دمای اتاق قرار گرفته و سپس دانسیته نوری آنها در طول موج ۵۹۵ نانومتر تعیین شد با و با تهیه منحنی استاندارد حاصل، محتوای پروتئین نمونه ها محاسبه گردید (Bradford 1976).

۲ گرم وزن تر از اندام هوایی و ریشه به طور جداگانه، در ۳ میلی لیتر بافر $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ (Ph=۶/۱) حاوی ۰/۱ میلی مول EDTA ساییده و سپس با دور $12000 \times g$ 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. ۳ میلی لیتر مخلوط واکنش حاوی: ۱/۵ میلی لیتر بافر $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ (ph=6/1) 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 ریبوفلاوین (riboflavin) و ۳۰۰ میلی مول عصاره آنزیمی تهیه شد و لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در معرض نور قرار گرفتند. سپس دانسیته نوری آن توسط اسپکتروفوتومتر مدل GBC cintra 6 ساخت استرالیا در ۵۶۰ نانومتر اندازه گیری 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. ۳ میلی لیتر مخلوط واکنش حاوی: ۱۶۰۰ میلی مول بافر فسفات پتاسیم (pH=۶) حاوی EDTA ۰/۱ میلی مول، آسکوربیک اسید ۰/۵ میلی مول، H_2O_2 ۰/۵ میلی مول و عصاره آنزیمی به میزان ۴۰۰ میکرولیتر تهیه و اکسیداسیون آسکوربات در طول موج ۲۹۰ نانومتر به مدت ۱ دقیقه سنجیده شد.

سنجش آنزیم پراکسیداز محلول (SPO)

بخش بر رو شناور حاصل برای سنجش آنزیم پراکسیداز محلول استفاده شد. به منظور سنجش فعالیت پراکسیداز ۳ میلی لیتر مخلوط واکنش شامل: بافر فسفات پتاسیم ۱۹۵۰ میلی مول (pH= ۶/۱)، ۵۰۰ میلی مول گایاکول و ۵۰۰ میلی مول پراکسید هیدروژن (H₂O₂) تهیه شد و سپس با افزودن به ۵۰ میلی مول عصاره آنزیمی دانسیته نوری آن در ۴۷۰ نانومتر به مدت ۱ دقیقه اندازه گیری شد. فعالیت آنزیم بر حسب تغییرات جذب به نسبت mg پروتئین عصاره بیان گردید (Kjalke et al., 1992).

سنجش آنزیم پلی فنل اکسیداز (PPO)

بخش بر رو شناور حاصل برای سنجش آنزیم پلی فنل اکسیداز استفاده شد. ۳ میلی لیتر مخلوط واکنش حاوی: بافر فسفات پتاسیم ۶۰ میلی مول (pH=۶/۱)، ۰/۵ میلی مول ۴-متیل کاتکول ۰/۰۲ مولار و ۰/۵ میلی مول عصاره آنزیمی تهیه شد. 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 گلوکاتایون ترانسفراز (GST)

بخش بر رو شناور حاصل برای سنجش آنزیم گلوکاتایون ترانسفراز استفاده شد. ۳ میلی لیتر مخلوط واکنش حاوی: بافر فسفات پتاسیم ۸۰۰ میلی مول (pH=۵/۶)، ۵۰ میکرو لیتر گلوکاتایون احیا و ۵۰ میکرو لیتر کلرو دی نیترو بنزن (CDNB) و ۱۰۰ میکرو لیتر عصاره آنزیمی تهیه شد. 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 دآلدئید با تیوباربیتوریک اسید (TBA) تشکیل کمپلکس رنگی می دهد که غلظت آن با دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه گیری می شود. به ۱ میلی لیتر از بخش بر رو شناور حاصل، ۱ میلی لیتر تیو باربیتوریک 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 نمونه ها در طول موج ۵۳۲ نانومتر و ۶۰۰ نانومتر تعیین شد. میزان MDA با استفاده از ضریب جذب ثابت $\epsilon = 155 \text{ Mm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ و تفاوت جذب در دو طول موج ذکر شده محاسبه شد.

سنجش میزان کلروفیل

سنجش میزان کلروفیل برگ با روش (Dlementina, 2008) انجام شد. به این منظور ۲۰۰ میلی گرم از نمونه‌ها با ۳ میلی لیتر استن ۸۰ درصد به طور کامل ساییده شد. عصاره حاصل با قیف حاوی کاغذ صافی در بالن ژوژه ۲۵ میلی لیتری صاف شد. به منظور جمع‌آوری کامل کلروفیل نمونه، کاغذ صافی با استون ۸۰ درصد چندین بار شستشو داده شد و سپس محتوای بالن با استون به حجم ۲۵ میلی لیتر رسانده شد. دانسیته نوری عصاره کلروفیل در طول موج های ۶۶۳ و ۶۴۵ نانومتر خوانده شد (Heldrich, 1990). مقدار کلروفیل a و b نمونه‌ها مطابق معادله‌های زیر محاسبه گردید.

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

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

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.

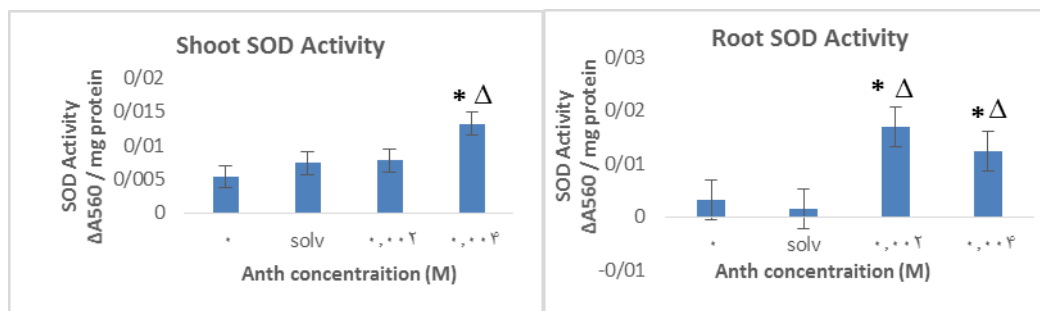
آنالیزهای آماری

کلیه 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

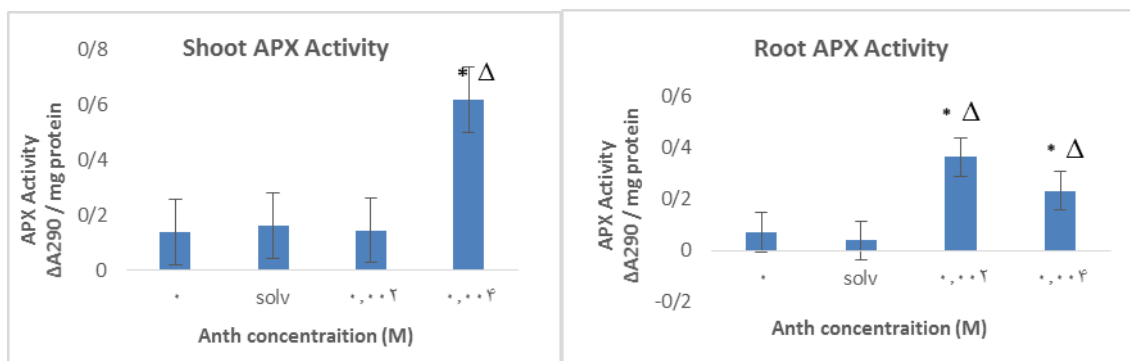
نتایج حاصل از اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) در اندام هوایی و ریشه گیاه مدیکاگو ساتیوا نشان دهنده افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم SOD هم نسبت به شاهد و هم نسبت به تیمار استن بود. در ساقه، روند افزایشی فعالیت آنزیم در تیمار با دوز ۴ میلی مولار آنتراسن در مقایسه با تیمار با دوز ۲ میلی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



شکل ۱: فعالیت SOD در تیمار با دوز های 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 معنی داری گروه‌ها نسبت به شاهد با علامت * و نسبت به حلال با علامت Δ نشان داده شده است

میزان فعالیت آنزیم APX در اندام هوایی و ریشه

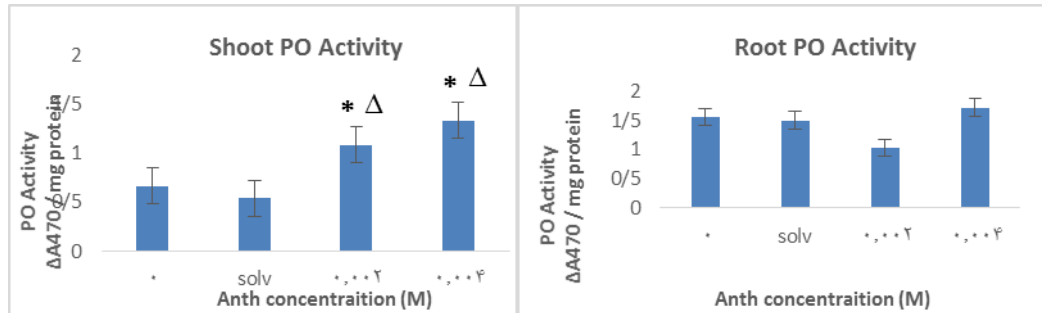
با توجه به نتایج به دست آمده فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) در اندام هوایی و ریشه گیاه مدیکاگو ساتیوا در دوز ۴ میلی مولار آنتراسن نسبت به شاهد و همچنین تیمار استن افزایش داشته است. این افزایش در سطح $p \leq 0.05$ نیز معنی‌دار بود (شکل ۲).



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 معنی داری 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

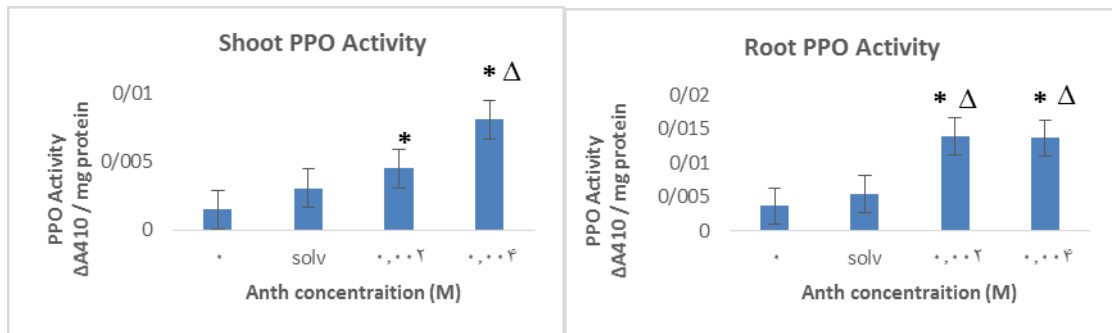
میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز محلول (SPO) در ساقه و ریشه در گروه های تحت تیمار با آنتراسن نسبت به گیاهان شاهد و تیمار استن افزایش یافته است که این افزایش در سطح $p \leq 0.05$ معنی دار بود (شکل ۳).



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 معنی داری 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

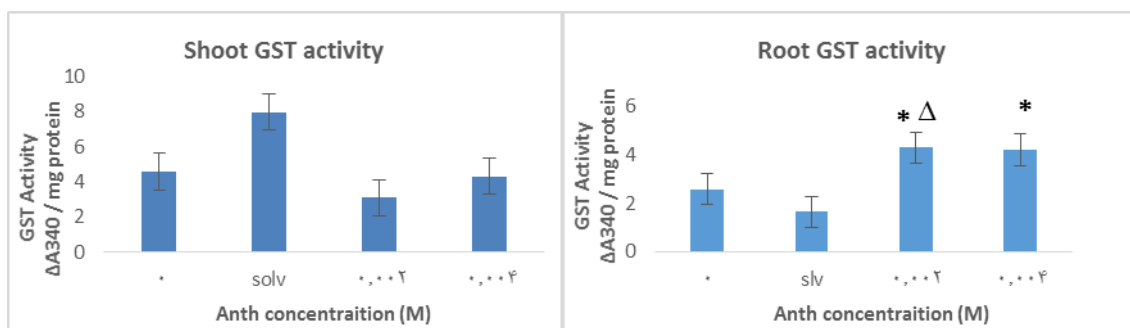
نتایج حاصل از سنجش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز (PPO) در ساقه و ریشه نشان‌دهنده افزایش میزان فعالیت این آنزیم در گروه های تحت تیمار با آنتراسن نسبت به گروه شاهد و تیمار استن است، این افزایش فعالیت PPO در سطح $p \leq 0.05$ معنی‌دار بود (شکل ۴).



شکل ۴: 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 معنی داری گروه‌ها نسبت به شاهد با علامت * و نسبت به حلال با علامت Δ نشان داده شده است.

میزان فعالیت آنزیم GST در اندام هوایی و ریشه

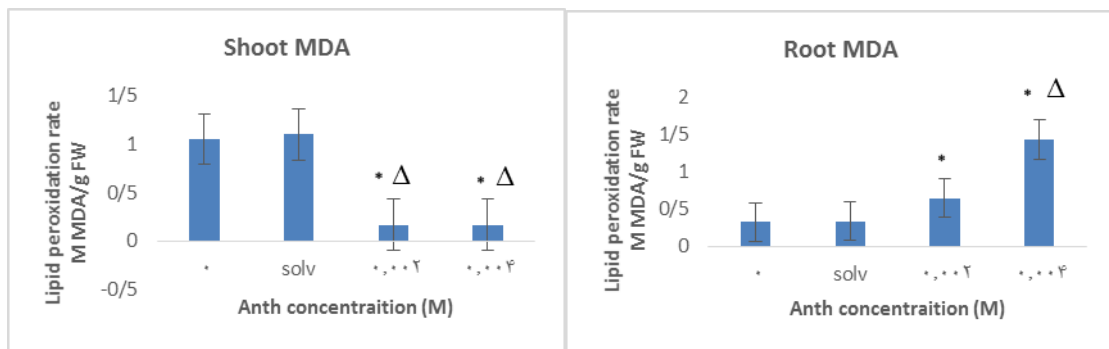
نتایج حاصل از اندازه‌گیری گلوپتاتین ترانسفراز (GST) در اندام هوایی گیاه مدیکاگو ساتیوا نشان داد که تیمار آنتراسن بر میزان گلوپتاتین ترانسفراز اثری نداشته و در مقایسه با گیاهان شاهد و تیمار استن، تیمار با دوزهای ۲ و ۴ میلی مولار آنتراسن سبب افزایش یا کاهش معنی‌دار فعالیت GST نگردیده است ولی نتایج حاصل از اندازه‌گیری گلوپتاتین ترانسفراز در ریشه گیاه مدیکاگو ساتیوا نشان داد که تیمار آنتراسن بر میزان گلوپتاتین 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).



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 معنی داری گروه‌ها نسبت به شاهد با علامت * و نسبت به حلال با علامت Δ نشان داده شده است.

میزان MDA در اندام هوایی و ریشه

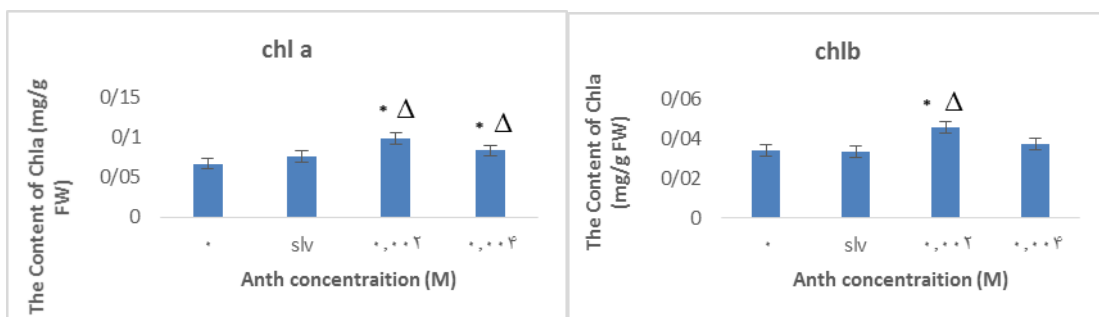
نتایج حاصل از اندازه‌گیری مالون دی آلدئید (MDA) در اندام هوایی گیاه مدیکاگو ساتیوا نشان داد که تیمار آنتراسن بر میزان مالون دی آلدئید اثرکاهنده داشته و در مقایسه با گیاهان شاهد و تیمار استن، تیمار با دوزهای ۲ و ۴ میلی مولار آنتراسن سبب کاهش معنی‌دار فعالیت MDA گردید که این اختلاف در سطح $p \leq 0.05$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



شکل ۶: فعالیت MDA 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 معنی داری گروه‌ها نسبت به شاهد با علامت * و نسبت به حلال با علامت Δ نشان داده شده است.

میزان کلروفیل a و b

مقادیر حاصل از سنجش محتوای کلروفیل a و b در گیاهان شاهد در مقایسه با گیاهان تیمار شده با آنتراسن افزایش معنی‌دار 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 $p \leq 0.05$ نسبت به شاهد و تیمار استن معنی‌دار بود (شکل ۷).



شکل ۷: فعالیت کلروفیل b و a در تیمار با دوزهای ۴۰۲ میلی مولار آنتراسن نسبت به گروه کنترل، داده‌ها میانگین ۵ تکرار و میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف معیار می‌باشد. معنی‌داری در $p \leq 0.05$ در نظر گرفته شده است معنی داری گروه‌ها نسبت به شاهد با علامت * و نسبت به حلال با علامت Δ نشان داده شده است.

بحث

تاثیر آنتراسن بر سیستم آنتی اکسیدانت

در شرایط تنش، تولیدگونه‌های فعال اکسیژن (ROS) نظیر (H₂O₂)، (OH·) و (O₂·-) در میتوکندری و کلروپلاست قطعی است. با افزایش این ترکیبات به عنوان پیامبر ثانویه مسیر علامت رسانی در گیاه ایجاد می‌شود. به دنبال تغییرات فوق آنزیم‌های متابولیکی حساس و نیز ترکیبات غیر آنزیمی در جهت تعدیل اثرات تنش فعالیت می‌کنند. ROS به نوکلئوتیدها، پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و اسیدهای چرب حمله می‌کنند. گیاهان مکانیسم‌هایی را برای از بین بردن این ترکیبات به خدمت می‌گیرند مانند آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POD)، اسکوربات پراکسیداز (APX) و گلوتاتیون ترنسفراز (GST) (liuh weimanet al., 2009). گزارشات متعدد نیز نقش فلزات سنگین مانند آلومینیوم را در تولید گونه‌های فعال اکسیژن مولکولی و ایجاد استرس کنند اکسیداتیو تایید می‌کنند (Devi et al., 2003).

مهم‌ترین و اولین آنزیم آنتی‌اکسیدان در تمام ارگانیسم‌های هوازی سوپر اکسید دیسموتاز SOD می‌باشد که در کاهش مستقیم متابولیت‌های اکسیژن فعال نقش دارند. این آنزیم به عنوان آنتی کارسینوژن عمل کرده و مانع شروع و تبدیل مراحل کارسینوژنز می‌شود (Cunningham et al. 1984). سوپر اکسید یکی از اصلی‌ترین گونه‌های اکسیژن فعال در سلول است، SOD می‌تواند باعث تبدیل رادیکال سوپر اکسید به هیدروژن پراکسید شود (McCord and Fridovich, 1969). نقش اصلی حفاظت در مقابل (ROS) بر عهده آنزیم سوپراکسید دیسموتاز می‌باشد (Ghanati et al., 2005). این آنزیم اولین سد دفاعی را تشکیل می‌دهد که رادیکال‌های سوپر اکسید را به پروکسید هیدروژن تبدیل می‌کند. سپس پراکسید هیدروژن می‌تواند توسط

آنزیم آسکوربات پراکسیداز در سیکل آسکوربات - گلوکاتیون که در کلروپلاست عمل می کند 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 کرده اند. همچنین Naser و همکارانش در سال ۲۰۱۲ افزایش میزان SOD تحت تیمار کادمیوم در گندم را گزارش کردند. بنابراین به نظر می رسد 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 می شود، 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 واکنش گره های اکسیژن عمل کرده باشد (Boojar et al. 2007).

در تحقیق حاضر افزایش معنی دار فعالیت این آنزیم در ساقه گیاهان تیمار شده با آنتراس در غلظت ۴ میلی مولار گوپای 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 توجیه است. در حالی که در ریشه گیاهان تحت تیمار شروع این افزایش معنی دار را از غلظت ۲ میلی مولار شاهد هستیم که باتوجه به تجمع بیشتر رادیکال سوپر اکسید در واکنش های ریشه گیاه نسبت به بخش هوایی قابل توجیه است. با توجه به اثرات مضر پراکسید هیدروژن به عنوان محصول واکنش فوق، تبدیل این ترکیب در مراحل بعدی ضروری می باشد. در گیاهان این واکنش با فعالیت CAT، PO، APX، و تبدیل H_2O_2 به H_2O کاتالیز می شود. 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 می کند (Ghanati et al., 2005). اسید آسکوربیک یک مولکول کوچک فراوان در گیاهان و یک ماده کلیدی در شبکه آنتی اکسیدانی شامل آسکوربات، گلوکاتیون، آلفا - توکوفرول و یکسری از آنزیم های آنتی اکسیدان است. همچنین نشان داده شده است که اسید آسکوربیک نقش های متعددی در رشد گیاه از جمله تقسیم سلولی، گسترش دیواره سلولی و سایر پدیده های رشدی دارد (Pignocchi and Foyer, 2003; Conklin, 2001). آنزیم Apx پراکسید هیدروژن را در کلروپلاست، سیتوسل، میتوکندری و پراکسی زوم سلول های گیاهی به آب تبدیل می کند و پتانسیل هیدروژن لازم را از آسکوربات احیا می کند (Foyer and Nector, 2005). آسکوربات پراکسیداز در واکنش آسکوربیک اسید با

پراکسید هیدروژن به ترتیب سبب تشکیل اسید مونو دهیدروآسکوربات 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 لیسینانیوس (*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 H₂O₂ نبوده و گیاه برای افزایش قدرت سازگاری خود تولید آنزیم APX را افزایش می‌دهد تا با کاهش میزان H₂O₂ 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 H₂O₂ در پاسخ به حرکت اولیه SOD در افزایش تولید H₂O₂ می‌باشد.

در حالی که در ریشه گیاه شروع افزایش معنی دار آنزیم APX برای حذف H₂O₂ 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 تنش‌های زیستی و غیرزیستی تولید می‌شوند. پراکسیدازها معمولاً واکنش اکسیداسیون و احیا را بین پراکسید هیدروژن به عنوان گیرنده الکترون و انواع زیادی از سوبستراها مثل ترکیبات فنلی، اسید اسکوربیک، آمین‌های آروماتیک و سیتوکروم C کاتالیز می‌کنند و به عنوان آنزیم‌های سم‌زدایی گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر عمل می‌کنند. آنزیم پراکسیداز موجب شکسته شدن هیدروژن پراکسید در سلول می‌شود و بدین شکل از تولید ROS ها 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).

پژوهش‌های زیادی در مورد اثر فلز سنگین روی بر فعالیت آنزیم پراکسیداز صورت گرفته است، چائویی (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 H₂O₂ 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 شریط 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 H₂O₂ 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 (بویژه O-دی فنل ها) در شرایط تنش سبب تولید ترکیبات جاروب‌کننده H₂O₂ مانند سمی کوئینون ها و کوئینون ها می‌گردد. این واکنش در گیاهان با پلی فنل اکسیدازها (لاکازها و کاتکول اکسیدازها) و پراکسیدازها کاتالیز می‌شود (Pourcel et al. 2006). آنزیم پلی فنل اکسیداز (PPO) با ورود به سیتوزول بافت های گیاهی آسیب دیده (آسیب مکانیکی) و ترکیب با مولکول اکسیژن واکنش اکسیداسیون ترکیبات فنلی به O-کوئینون‌ها را کاتالیز می‌کند. همچنین آئوریدین سنتاز (پلی فنل اکسیداز) واکنش اکسیداتیو تبدیل چالکون ها به آرون ها (گروهی از فلاونوئید های گیاهی) را در واکوئل 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 غشاها، کاهش سمیت آنتراسن و در نتیجه کمک به رشد گیاه می باشد. 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 ارگانسیم ها را در مقابل بسیاری از اثرات مخرب الکتروفیلها و پراکسیدها محافظت می کند. این آنزیم عامل مفیدی در از بین بردن هیدروکربن های چند حلقه ای است (Dixit et al., 2011, ۲۰۰۶, paskova et al.).

میزان GST در ریشه گیاهان تحت تیمار مانند سایر آنزیمهای آنتی اکسیدانت (SOD, APX, PO, PPO, MAD) در غلظت ۲ میلی مولار آنتراسن شروع به افزایش معنی دار می کند ولی با افزایش غلظت آنتراسن تا حد ۴ میلی مولار میزان GST افزایش پیدا نمی کند 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 آلدئید یک محصول سمی سلولی ناشی از پروکسیداسیون چربی ها و نشان دهنده میزان تولید رادیکالهای آزاد و بافت های تخریب شده است (Ohkawa et al., 1979). میزان مارکرزیستی مالون دی آلدئید در بافت گیاهی معیاری برای تعیین وضعیت پرو اکسیداسیون چربی ها است. پرو اکسیداسیون چربی ها در ارتباط با تولید سوپر اکسید می باشد. مثلاً، وجود مقادیر بالای فلزات سنگین در گیاه باعث افزایش تولید سوپر اکسید می شود. بنابراین، افزایش میزان بیومارکر مالون دی آلدئید نشان دهنده آن است که یون های فلزی توانسته اند باعث تحرکی ظرفیت تولید رادیکال های آزاد در گیاهان عالی شوند (Luna et al., 1994). برخی از یون ها با ویژگی های شدید ردوکس مانند مس و شاید حتی یون هایی که فاقد این ویژگی ها هستند مانند روی و کادمیوم به عنوان آغازکننده های پراکسیداسیون لیپید غشا و تحریک کننده های تولید گونه های فعال اکسیژن شناخته شده اند. پراکسیداسیون لیپید به دلیل فعالیت لیپوکسی ژنازها افزایش می یابد، مالون دی آلدئید (MDA) فراوان ترین محصول حاصل از تجزیه لیپید آلدئیدی به شمار می آید (Davey et al., 2005). مطالعه فناتی و نعمتی در سال ۱۳۸۹ تحت تأثیر عنصر آلومینیوم در ریشه گیاه لیسینتوس به دنبال افزایش کاتالاز و کاهش H₂O₂ و در نتیجه کاهش آسیب به غشای پلاسمایی کاهش مالون دی آلدئید را گزارش کرده اند (فناتی و نعمتی، ۱۳۸۹). با اعمال تیمار آنتراسن در بخش هوایی میزان MDA کاهش پیدا کرده است که در هر دو غلظت تیمار آنتراسن این اختلاف نسبت به گروه شاهد معنی داری باشد. که این نتایج نشان دهنده سازگاری بخش فتوسنتز کننده گیاه با شرایط تنش و غلبه گیاه بر رادیکال های آزاد می باشد. شاید بتوان گفت: این نتایج موید این مطلب است که سیستم آنتی اکسیدانی بخش هوایی گیاه مدیکاگو ساتیوا توانایی از بین بردن رادیکال های آزاد را در حضور تیمار آنتراسن داشته و مانع از خسارت اکسیداتیو به گیاه می شود. در حالی که تجمع بالای آنتراسن در ریشه گیاه و در نتیجه غلبه این هیدرو کربن حلقوی بر سیستم آنتی اکسیدانی گیاه، پراکسیداسیون لیپید غشایی را به طور معنی داری در

هر دو تیمار آنتراسن افزایش داده است، به طوری که مطابق با نمودار (۶) با اعمال تیمار آنتراسن در ریشه گیاه میزان MAD افزایش پیدا کرده است که این افزایش در هر دو غلظت متفاوت تیمار آنتراسن نسبت به گروه شاهد معنی دار است. در نهایت پراکسیداسیون لیپید غشایی در ریشه گیاه با مختل کردن سیستم ریشه ایی باعث ضعیف شدن گیاه می شود.

کلروفیل a و b

فتوسنتز یکی از حساس ترین فرآیندهای متابولیکی نسبت به سمیت فلزات سنگین است و مطالعات متعددی بازدارندگی فتوسنتز در گیاهان مختلف رشد یافته تحت تنش فلزات سنگین را گزارش کرده اند. فلزات سنگین کاهش فتوسنتز را ممکن است از طریق بازگشایی روزنه، آسیب به سازماندهی فراساختاری کلروپلاست، تغییر در متابولیت های فتوسنتزی، جایگزینی یون هایی مانند منیزیم و منگنز و غیره با سرب در کلروپلاست و ممانعت از ساختن یا تجزیه رنگیزه های فتوسنتزی القاء کند. سمیت فلزات سنگین همچنین تنش اکسیداتیو را از طریق تولید بیش از حد گونه های فعال اکسیژن شامل رادیکال های سوپراکسید، رادیکال های هیدروکسیل و هیدروژن پراکسید القاء می کند (Reddy et al., 2005).

در بررسی های حاضر محتوای کلروفیل a و b در اندام هوایی پس از تیمار آنتراسن افزایش معنی داری یافت. این تغییر با افزایش کارایی سیستم دفاعی گیاه و تاخیر فرآیند پیری هم راستا است به طوری که با افزایش میزان غلظت آنتراسن از ۲ به ۴ میلی مولار، میزان کلروفیل a و b در بخش هوایی افزایش می یابد. Flocco ظرفیت کلی کلروفیل (chl a , chlb) برگ های یونجه ایی که در معرض فنان ترین قرار گرفته اند را سنجیده بود در آخر آزمایش، تفاوت های چشمگیری در سطوح chl a بین گیاهان در معرض فنان ترین و گیاهان کنترل پیدا نکرده بود. می توان گفت: افزایش میزان فعالیت آنزیم های سیستم آنتی اکسیدان و نیز ترکیبات آنتی اکسیدان سبب حمایت فرآیند های متابولیسم در برابر اثرات سمی آنتراسن می شود. Flocco بیان کرده است که آنزیم های گیاهی خانواده Fabaceae با داشتن P450 توانایی اکسیده کردن ترکیبات آروماتیک چند حلقه ایی را دارند و این آنزیم ها راه اصلی برای دفع مسمومیت این ترکیبات می باشند. 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 نشانه ای زیستی نامشخص آلودگی محیطی، استفاده میشود و یک همبستگی مثبت بین میزان پروکسیداز بافت های گیاهی و بی کلرو فنیل (PCB) و PAH ها گزارش کرده بود. با در نظر گرفتن نقش پروکسیدازها در سم زدایی PAH ها یا فشار وارده در حضور آلاینده های ارگانیک، به بررسی فعالیت پروکسیداز ریشه های گیاهان یونجه در طول آزمایش دفع پرداخته شده است (Flocco et al., 2014).

نتیجه گیری کلی

با تاثیر آنتراسن با غلظت های ۲ و ۴ میلی مولار افزایش نسبی آنزیم‌های آنتی اکسیدان موجب کاهش تولید و تجمع گونه‌های اکسیژن واکنش گر (ROS) شده که این آنزیم‌ها (SOD, PO, PPO, APX, GST) قادرند تنش اکسیداتیو را مهار کنند. با افزایش اثر آنزیم‌ها مخصوصا در غلظت ۴ میلی مولار آنتراسن و از بین رفتن H₂O₂ های موجود در گیاه، شاخص پراکسیداسیون لیپید کاهش یافت. همچنین به دلیل تاثیر 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 می افتد و این روند افزایش به طور نسبتا منظم در اندام هوایی در غلظت ۴ میلی مولار آنتراسن، و در ریشه در غلظت ۲ میلی مولار رخ می دهد. آنتراسن بیشتر در ریشه تجمع پیدا می کند و با تجمع در ریشه و تاثیر بیشتر بر پراکسیداسیون لیپید غشای سلولهای ریشه باعث تضعیف سیستم ریشه ای در گیاه مدیکاگو ساتیوا می شود. 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 می توان اذعان داشت گیاه *Medicago sativa* مانند بعضی از گیاهان دیگر این خانواده دارای توانایی نگه‌داری مواد شیمیایی در ریشه خود می باشد.

منابع

فهرست منابع فارسی

۱. ابراهیمی، س. شایگان، ج. ملکوتی، م. اکبری، ع. (۱۳۹۰) ارزیابی زیست محیطی و سنجش برخی شاخص های 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. عبدالهی، 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 آنزیم های 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 هیدروکربن های 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 آلودگی های نفتی در رسوبات ساحلی. علوم و تکنولوژی محیط زیست. دوره پانزدهم، شماره ۳.
۸. چاپارزاده، ن.، زرنندی میاندوآب، ل. (۱۳۹۰). اثر شوری بر محتوای رنگدانه‌ای 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). تاثیر فاز محلول نفت خام بر میزان تغییرات آنزیمهای آنتی اکسیدانی در بچه فیل ماهی (*Huso huso*) به عنوان بیو مارکر آلودگی نفتی. نشریه توسعه آبرزی 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 لیسیانتوس (*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 ریشه های گیاه لیسیانتوس (*Eustoma grandiflora L.*) زیست شناسی گیاهی ایران. سال دوم. صفحه ۴۱-۵۳. شماره دوم.
۱۵. کوچکی، ع. علیزاده، 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 بخش های رویشی و زایشی انگور شاهانی. فصلنامه علمی پژوهشی زیست شناسی تکوینی. سال سوم، شماره ۱۰.
۱۷. مللی، ا. افیونی، م. خوش گفتار منش، ا. حاج عباسی، م. (۱۳۹۰) گیاه پالایی هیدرو کربن های نفتی لجن فاضلاب پالایشگاه اصفهان. سال پانزدهم، شماره ۵۶.
۱۸. موافقی، ع. (۱۳۹۱). مطالعه تکوینی فراساختار سلولهای کلاهیک در ریشه نخود (*Pisum sativum L.*) زیست شناسی 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., Wieczorek 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. (1991). Increased resistance to copper-induced damage of root plasma membrane in copper tolerant *Cilene cucubalus*. *Physiol. Plant*, 82: 528-533.
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. 1236-1248.
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 Biology*. 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.* 54:3658-3662.
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., Huang 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 treatment 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 StatesEnvironmental ProtectionAgency.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 Astragalussect.Anthyloidei (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. Nejadsattari,T.(2015). Vegetative and reproductive anatomy of *Vigna radiata* L..*Tropical plant re search*. 2(1):23-۲۹.
60. Smith M. J., Flowers.T.H., Duncan H. J., Alder J. (2006) Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on germination and sub sequent growth of grasses and legumens 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. Wetzal,A.Alexander,S.Brandt,S.Haas,R.Werner,D.(1994)Reduction by fluoranthene of coper 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 acstivnm* 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.

Abstract

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) are one of the tensions that inhibit plant growth and create imbalance between the production of Reactive Oxygen Species and antioxidant defense activities of the plant. Alfalfa and other plants have a root system of value can be a factor in the disposal of organic compounds such as PAHs. Anthracene is the main pollutants in the petrochemical industry, which is located on the list of toxic pollutants, US Environmental Protection Agency (USEPA). In this study is to evaluate the effect of anthracene on some parameters of oxidative stress in *Medicago sativa* after 12 days of treatment with anthracene (2, 4 mmol per liter) in hydroponics, shoot and root tissues of the plants were harvested and used to measure biochemical and physiological parameters. The activity of super oxide dismutase (SOD), poly phenol oxidase (PPO), glutathione transferase (GST), soluble peroxidase (PO), malon dialdehyde and enzyme ascorbate peroxidase (APX) in shoots and roots, as well as the activity of chlorophyll b and a the shoot was determined. The results show that The activities of SOD, APX, SPO, PPO and GST on the shoot of anthracene concentrations of 4 mM is significant increase compared to the control treatment but at the root of 2 mM anthracene treated us with the greatest differences were in the control group. Anthracene treatment, decreased MDA levels in shoot, and root significantly increased compared to control group. It is also associated with increased concentrations of chlorophyll a and b leaves anthracene higher than the control group. Increase antioxidant enzyme superoxide dismutase to remove superoxide radicals and increase the activity of enzymes associated with treatment anthracene ascorbate peroxidase, glutathione transferase and peroxidase solution seeks to increase levels of anthracene and SOD enzyme is in line with the increase. It also increases the activity of the enzyme polyphenol oxidase, the result has been the production of phenolic compounds in the plant. On the other indicate a hand, MDA as an indicator of membrane lipids is in the present study peroxidation significant reduction in stem confronted antioxidant plant but increased lipid peroxidation it was at the root of, show that with the increase of anthracene at the root (the accumulation of the toxin in the roots), the plant (lysis of mantle tissue of origin) deal with the hydrocarbon loses power.

Key words: anthracene toxicity, oxidative stress, *Medicago sativa*, Hydroponic culture.