مقاله کامل پژوهشی

اثرات فیزیولوژیک تنش ناشی از سمیت فنانترن در گیاه گندم رویش یافته در خاک‌هایی با بافت متفاوت

فاطمه صابونچی محمدی[۱]، سیدیحیی صالحی لیسار*[۱] و احمد مسن هرزندی[۲]
[۱] گروه زیست شناسی گیاهی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
[۲] آزمایشگاه آب، سازمان آب و فاضلاب آذربایجان شرقی، تبریز، ایران

چکیده

هیدورکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای (PAHs) گروه متنوعی از ترکیبات آلاینده آلی را شامل می‌شوند که می‌توانند به‌وسیله ریشه از خاک و یا به‌وسیله اندام هوائی از هوا جذب گیاهان شوند. میزان جذب آن‌ها از خاک و تاثیرگذاری آن‌ها بر گیاهان به عوامل محیطی مختلف نظیر خصوصیات فیزیکوشیمیایی خاک بستگی دارد. در این پژوهش میزان جذب و انباشت فنانترن و تاثیر آن بر رشد و شاخص‌های فیزیولوژیک گیاه گندم رویش یافته در خاک حاوی ۵۰ میلی‌گرم در گرم از فنانترن مورد بررسی قرار گرفته است. هم‌چنین به‌منظور بررسی تاثیر بافت خاک بر میزان تاثیرگذاری فنانترن، گیاهان در سه نوع خاک با بافت لوم رسی، لومی و لوم رس شنی حاوی فنانترن به مدت یک ماه کشت شدند. فنانترن موجب کاهش جوانه زنی بذر و رشد گیاه گندم گردید و این اثر در خاک‌هایی با بافت درشت شدیدتر بود. فراهمی فنانترن در خاک و هم‌چنین جذب آن توسط گیاه گندم در خاک با بافت درشت نسبت به خاک با بافت ریز بیش‌تر بود. فنانترن موجب افزایش غلظت مالون دی‌آلدئید و کاهش غلظت فسفر و رنگیزه های فتوسنتزی گردید که این اثر نیز در گیاهان رشد یافته در خاک با بافت درشت مشهودتر بود. نتایج این پژوهش نشان‌گر تاثیر منفی فنانترن بر رشد گیاه گندم به‌ویژه در خاک با بافت درشت‌تر و حاوی درصد بالاتر از شن بود که احتمالا به‌دلیل جذب سطحی پائین فنانترن بر روی ذرات شن، افزایش فراهمی در خاک و در نتیجه جذب بیش‌تر آن و در نهایت تاثیر شدیدتر بر گیاهان می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: بافت خاک، جذب فسفر، کلروفیل، مالون دی‌آلدئید، PAHs

مقدمه

روند صنعتی شدن در جهان باعث افزایش حضور آلاینده‌ها در محیط زیست گردیده است. هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای (PAHs) گروه بزرگ و متنوعی از آلاینده‌های آلی هستند که طیف گسترده‌ای از خواص شیمیائی، ساختار، حلالیت در آب و تعداد حلقه‌های آروماتیک را دارند [۲۱]. این ترکیبات به‌طور عمده از فعالیت‌های صنعتی و احتراق ناکامل سوخت‌های فسیلی [۱٦]، و قسمتی نیز از طریق فرآیندهای طبیعی نظیر آتش‌سوزی جنگل‌ها [۲٦] و فوران آتش‌فشان‌ها [۱۲] به محیط آزاد می‌شوند. PAHs عموما ترکیبات پایدار در خاک می‌باشند [۱۲] و اثرات منفی آن‌ها بر موجودات زنده، نظیر خواص جهش‌زائی نشان داده شده است [۱۵]. گیاهان می‌توانند PAHs را از آب [۲۹] و خاک [۹] آلوده جذب نمایند و غلظت بالای آن‌ها در محیط رشد موجب دگرگونی‌هائی نظیر

نویسنده مسئول، پست الکترونیک: y_salehi@tabrizu.ac.ir

تغییر در پیکربندی هسته، مهار سنتز DNA، اختلال در عملکرد غشای پلاسمائی، متورم شدن کریستای میتوکندری و پهن‌شدگی سیسترن‌های شبکه آندوپلاسمی می‌شود [۱۷].

شدت تأثیرگذاری PAHs بر گیاهان و سرعت تجزیه و معدنی شدن هیدروکربن‌ها در خاک‌های مختلف متفاوت است [۳، ۲۳ و ۳۰]. فراهمی زیستی PAHs در خاک تحت تاثیر بسیاری از عوامل از جمله ساختار شیمیایی [۲۵] و غلظت اولیه آنها [۲۹]، جمعیت میکروبی [۱۵] و ویژگی‌های فیزیکی و شیمیائی خاک [۱۵ و ۲۰] است. هم‌چنین عوامل محیطی نظیر دما و رطوبت نیز سرعت و میزان تجزیه زیستی آن‌ها را متاثر می‌کند [۱٤].

فنانترن (Phenanthrene) یک هیدروکربن آروماتیک چندحلقه‌ای با وزن ملکولی پائین و متشکل از سه حلقه بنزنی است [۳]. این ترکیب به فراوانی در محیط‌های آلوده با PAHs [۲۰] و در اندام‌های مختلف گیاهان رویش یافته در مناطق فوق وجود دارد [۲۹]. گیاه گندم از جمله گیاهان زراعی است که ورود ترکیبات سمی به آن علاوه بر تاثیرات منفی در رشد، نمو و عملکرد گیاه، می‌تواند سلامت غذائی جوامع را نیز با تهدید مواجه سازد. در این پژوهش علاوه بر ارزیابی میزان جذب این ترکیب در گیاه گندم و تاثیر بافت خاک در آن، برخی تغییرات فیزیولوژیکی ایجاد شده در پاسخ به تنش ناشی از سمیت این ترکیب مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش ها

تهیه وآماده سازی خاک

خاک مورد استفاده در این مطالعه از مزارع دور از مناطق شهری و جاده‌ها به منظور به حداقل رساندن احتمال آلودگی خاک با آلاینده‌های محیطی جمع‌آوری گردید. خاک جمع‌آوری شده در محیط آزمایشگاه هواخشک شد و سپس با استفاده از غربال دو میلی‌متری الک گردید. درصد رس، شن و لای موجود در خاک با استفاده از روش هیدرومتری اندازه‌گیری شده [۱۱] و نوع بافت خاک لوم رسی (۳۵٪ شن، ۳۵٪ رس و ۳۰٪ سیلت) تعیین گردید. مقدار لازم از خاک هواخشک و الک شده، به‌منظور از بین بردن باکتری‌ها و اسپورهای قارچی که احتمالا می‌توانستند باعث تجزیه ترکیبات آلی شوند، در دمای ۱۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد و فشار یک اتمسفر به مدت یک ساعت در اتوکلاو سترون شد [۲۳]. برای تهیه خاک‌هایی با بافت متفاوت، به خاک جمع‌آوری شده از مزرعه مقدار ۲۵ و ۵۰٪ وزنی، شن دانه متوسط و سترون اضافه گردید. به این ترتیب دو نوع خاک با بافت لومی حاوی ٤۸٪ شن، ۲۸٪ رس و ۲٤٪ سیلت؛ و خاک با بافت لوم رس شنی حاوی ۵۷٪ شن، ۲۳٪ رس و ۲۰٪ سیلت به‌دست آمد. برای اعمال تیمار فنانترن در خاک‌ها، این ترکیب با غلظت $50\ mg\ kg^{-1}$ (Merck, Germany)، پس از حل شدن در استن (۹۹٪<) بر روی حجم کل خاک پخش شده و کاملا با خاک مخلوط گردید. در نهایت خاک‌های تیمار شده بین گلدان‌ها تقسیم شده و برای کشت گیاهان مورد استفاده قرار گرفتند. به‌منظور تبخیر استن از خاک و جلوگیری از اثرات احتمالی آن بر گیاهان، کشت گیاهان ۱۵ روز پس از اعمال تیمار فنانترن صورت گرفت.

کشت گیاهان

برای کشت گیاهان، ۱۰ عدد بذر گندم با محلول یک درصد هیپوکلریت سدیم به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی گردید و پس از شستشوی کافی با آب، در عمق یک سانتی‌متری خاک کاشته شدند و به منظور جوانه زنی به مدت پنج روز به تاریکی منتقل شدند. پس از این مدت تعداد پنج گیاه هم‌اندازه در هر گلدان حفظ شده و در شرایط آزمایشگاهی با دوره‌ی نوری ۱٦ ساعت روشنائی و ۸ ساعت تاریکی، رطوبت نسبی ۵۰ تا ٦۰٪ و دمای ۲۰ تا ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. سطح آب گلدان‌ها پس از توزین روزانه در حد ظرفیت مزرعه‌ای تنظیم شد و آبیاری گیاهان هر چهار روز با آب مقطر سترون در حد ظرفیت مزرعه‌ای انجام شد.

تعیین شاخص‌های رشدی

گیاهان به مدت یک ماه (پس از جوانه‌زنی) در شرایط آزمایشگاهی رشد کردند، سپس به‌منظور انجام سنجش‌های مورد نظر برداشت شدند. گیاهان برداشت شده به ریشه و اندام هوائی تفکیک شدند و پس از تعیین وزن تر، در پاکت‌های کاغذی به مدت سه روز در آون با دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد خشک گردیدند. در نهایت وزن خشک آن‌ها اندازه‌گیری شد.

سنجش غلظت رنگیزه‌های فتوسنتزی

برای سنجش غلظت کلروفیل a (Ca)، کلروفیل b (Cb)، کلروفیل کل (Ca + Cb) و کاروتنوئیدها، ۰/۱ گرم از اندام هوایی گیاهان با شش میلی‌لیتر استن ۹۹٪< در حمام یخ با استفاده از هاون چینی له شد و با کاغذ واتمن شماره ٤۲ صاف گردید. سپس بلافاصله جذب نوری عصاره‌ها در طول موج‌های ٦٤۵، ٦٦۳ و ٤۷۰ نانومتر توسط دستگاه

اسپکتروفوتومتر (Analytic Jena, Specol 200) قرائت شد و غلظت رنگیزه‌ها بر حسب واحد mg g^{-1} FW محاسبه گردید [۵].

سنجش غلظت مالون دی‌آلدئید (MDA)

به‌منظور بررسی میزان پراکسیداسیون لیپیدها، سنجش MDA بر اساس روش بومیناتان و دوران (۲۰۰۲) انجام گرفت. برای این منظور عصاره‌ی گیاهی در محلول ۰/۱٪ (W/V) از تری کلرو استیک اسید (TCA) در حمام یخ استخراج شده و به مدت پنج دقیقه در g ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ گردید. سپس نسبت یک به چهار از محلول روشناور با محلول ۲۰٪ از TCA حاوی ۰/۵٪ از تیوباربیتوریک اسید در لوله آزمایش با هم مخلوط شده و به‌مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس لوله‌ها به‌سرعت در یخ سرد شده و به‌مدت ۱۵ دقیقه در g ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شدند. هم‌زمان محلول‌های استاندارد در محدوده‌ی صفر تا ۱۰۰ نانومول از ۱،۱،۳،۳- تترا اتوکسی پروپان تهیه شده و جذب نمونه‌ها در ۵۳۲ نانومتر قرائت گردید. در نهایت غلظت MDA نمونه‌ها بر حسب واحد µmol g^{-1} FW محاسبه گردید.

استخراج فنانترن

برای استخراج فنانترن از نمونه‌های گیاهی، دو گرم از نمونه تر پس از شستشوی ذرات خاک چسبیده به آن توسط آب مقطر، با ۱۰ میلی‌لیتر از ۲-پروپانول مخلوط شده و در هاون چینی له گردید. ۲۰ میلی‌لیتر اتر نفت به همگنای حاصل اضافه و مخلوط به‌دست آمده توسط تنزیب چهار لایه صاف شد. سپس ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر و سه میلی‌لیتر سولفات سدیم اشباع (Na_2SO_4) به محلول فوق اضافه گردید و به‌مدت ۲۰-۱۰ ثانیه تکان داده شد. بعد از تشکیل دو فاز مشخص، فاز آبی (بخش زیرین) جدا و دور ریخته شد. فاز بالائی مجددا با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر و سه میلی‌لیتر سولفات سدیم اشباع شستشو شده و فاز آبی دور ریخته شد. فاز اتر نفت باقی مانده به لوله‌ی آزمایش منتقل شده، دو گرم از پودر سولفات سدیم به آن اضافه گردید و تا زمان سنجش در یخچال و در دمای ٤- درجه‌ی سانتی‌گراد نگه‌داری شد [۲۳].

برای استخراج فنانترن از خاک بر روی ۱۰ گرم از خاک ۱۵ میلی‌لیتر استن اضافه گردید و به مدت ۲٤ ساعت با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه تکان داده شد. سپس مخلوط به‌دست آمده با کاغذ واتمن شماره‌ی ٤۲ صاف گردید و محلول حاصل در ظروف در بسته تا زمان سنجش در دمای ٤- درجه‌ی سانتی‌گراد نگه‌داری شد [۲۱].

سنجش غلظت فنانترن

به‌منظور سنجش غلظت فنانترن در نمونه‌های گیاهی و خاک از دستگاه کروماتوگرافی گازی (Varian GC CP-3800) دارای شناساگر یونیزاسیون شعله‌ای (FID) استفاده شد. دمای تزریق نمونه ۳٤۰ درجه‌ی سانتی‌گراد بود و گاز هلیم (۹۹/۹۹۹۹٪<) با سرعت ثابت ۳۵ cm s^{-1} به‌عنوان گاز حامل مورد استفاده قرار گرفت. جداسازی با استفاده از ستون BP-5 (۰/۲۵ mm× ۳۰ m) با ضخامت فیلم ساکن ۰/۲۵ µ در مدت زمان ۳۵ دقیقه انجام شد. شروع جداسازی با دمای ۹۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه آغاز شد و دما از ۹۰ به ۳۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد با سرعت ۱۰ درجه در دقیقه افزایش یافت و هفت دقیقه در ۳۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد حفظ گردید. دمای FID در ۳۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد ثابت نگه داشته شد و گاز هیدروژن با استفاده از مولد هیدروژن (HG–2200, Claind) با سرعت ثابت ٤۰ mL min^{-1} تولید گردید.

سنجش غلظت عناصر

به‌منظور آماده‌سازی نمونه‌های گیاهی برای سنجش عناصر از روش هضم خشک استفاده شد. حدود ۰/۱ گرم از نمونه‌های خشک شده به مدت ۱۰ ساعت در کوره با دمای ۵۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد گذاشته شد. سپس بر روی نمونه‌های خاکستر شده یک میلی‌لیتر اسیدسولفوریک غلیظ و یک میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن ۳۷٪ افزوده شد. مخلوط فوق به‌منظور تبخیر بر روی صفحه‌ی حرارتی خشک شد. در نهایت رسوب باقیمانده پس از حل شدن در دو میلی‌لیتر اسید کلریدیک ٤٪ به حجم ۲۰ میلی‌لیتر رسانده شد. برای سنجش غلظت فسفر، یک میلی‌لیتر از هر نمونه با دو میلی‌لیتر از معرف آمونیوم وانادات ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O/NH_4VO_3$) مخلوط گردید، حجم محلول به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد و جذب نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ٤۲۰ nm نانومتر قرائت شد [۱۱]. برای سنجش غلظت سدیم و پتاسیم از روش طیف سنجی نشر اتمی (JENWAY pep7, UK) استفاده شد. منحنی استاندارد عناصر مذکور در محدوده ۵۰-۰ mg L^{-1} تهیه شد و در نهایت غلظت آنها در نمونه‌های گیاهی بر حسب واحد mg g^{-1} DW محاسبه گردید.

تجزیه آماری

آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کاملا تصادفی در سه تکرار و شش تیمار انجام شد. برای محاسبه میانگین، انحراف استاندارد و ترسیم نمودارها از نرم‌افزار Microsoft Excel 2007 استفاده شد. گروه‌بندی میانگین‌ها در سطح احتمال ۰/۰۵ با استفاده از آزمون Tukey و با نرم‌افزار Sigmastat 3.2 صورت گرفت.

نتایج و بحث

جوانه‌زنی

اثر منفی فنانترن بر جوانه‌زنی بذر گندم در تمام خاک‌های مورد بررسی مشاهده گردید (شکل ۱). با افزایش میزان شن خاک، درصد جوانه‌زنی بذر گندم در خاک‌های بدون فنانترن به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($p\leq۰/۰۵$) به‌طوریکه در خاک لوم رسی، لومی و لوم رس شنی به ترتیب ۹۰، ٦٧ و ٣٣٪ بود. خاک دارای مقادیر بالا از شن دارای توان نگه‌داری رطوبت پائین می‌باشد [٦] و از این‌رو کاهش جوانه‌زنی در خاک حاوی مقادیر بالا از شن قابل پیش‌بینی بود. درصد جوانه‌زنی گندم در خاک‌های لوم رسی، لومی و لوم رس شنی حاوی فنانترن به ترتیب ٨٧، ٦٣٪ و ١٥٪ بود. به این ترتیب حضور فنانترن در هر سه نوع خاک باعث کاهش جوانه‌زنی گردید. میزان کاهش در خاک لوم رسی حدود ٤٪، در خاک لومی برابر ٥٪ و در خاک لوم رس شنی برابر ٥٥٪ بود. به عبارت دیگر افزایش مقدار شن در خاک باعث تاثیر شدیدتر فنانترن و کاهش بیش‌تر جوانه‌زنی بذر گندم گردید. تاثیر منفی PAHs بر جوانه‌زنی بذر در گیاهانی نظیر *لپیدیوم ساتیوم* در غلظت ٥٠ و ١٠٠٠ $mg\ kg^{-1}$ PAHs [١٨]، و ذرت در غلظت ٢ $mg\ kg^{-1}$ فنانترن و ٢٠ $mg\ kg^{-1}$ آنتراسن [٢٧] نیز گزارش شده است. با این وجود، اسمیت و همکاران (٢٠٠٦) هیچ اثری منفی معنی‌داری تا ١٠٠٠ $mg\ kg^{-1}$ از مخلوط PAHs بر روی جوانه‌زنی هفت گونه از گندمیان و حبوبات مشاهده نکردند. ورود هیدروکربن‌ها به‌داخل بذر و آسیب به جنین از عمده دلایل کاهش جوانه‌زنی معرفی شده است [٢٤].

شکل ۱ تاثیر فنانترن بر درصد جوانه‌زنی گیاه گندم کشت شده در خاک‌هایی با بافت متفاوت. تفاوت مابین ستون‌هائی که دارای حروف مشترک می‌باشند از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد ($p\leq۰/۰۵$ و $n=۳$).

شاخص‌های رشد

افزایش مقدار شن در خاک‌های بدون فنانترن با کاهش اغلب شاخص‌های رشد گیاهان گندم همراه بود (جدول ١) که به‌دلیل ظرفیت پائین خاک‌های حاوی مقادیر بالا از شن برای تامین نیازهای تغذیه‌ای گیاهان می‌باشد [٦]. حضور فنانترن در هر سه نوع خاک باعث کاهش تمامی شاخص‌های رشد مورد مطالعه شد که در اغلب موارد معنی‌دار بود ($p\leq۰/۰۵$). شدت تاثیرگذاری فنانترن در خاک‌های حاوی درصد بالاتر از شن بیشتر بود، و تعداد گیاهان به اندازه‌ای کم بود که بسیاری از شاخص‌های رشد گیاهان رویش یافته در خاک لوم رس شنی و تیمار شده با فنانترن (پس از استفاده برای استخراج و سنجش غلظت فنانترن)، قابل اندازه‌گیری نبود. کاهش شاخص‌های رشد در خاک لوم رسی تیمار شده با فنانترن حداقل ٣٪ و حداکثر ٤٢٪ بود. این مقادیر در خاک لومی حداقل ٦/٣٪ و حداکثر ٩١/٨٪، و در خاک لوم رس شنی حداقل ١٢٪ و حداکثر ١٠٠٪ به‌دست آمد. PAHs دارای اثرات منفی شناخته شده بر جنبه‌های

متابولیسمی گیاهان می‌باشند [۷ و ۱۷] و تاثیر منفی تنش ناشی از غلظت‌های بالای PAHs بر رشد گیاهانی نظیر *آرابیدوپسیس تالیانا* [۱]، برنج [۸] و یونجه [۲۲] قبلا نیز گزارش شده است. افزایش تاثیرگذاری فنانترن در خاک‌های حاوی شن زیاد، احتمالا به‌دلیل کاهش قدرت جذب سطحی خاک، در نتیجه افزایش فراهمی فنانترن و در نهایت تماس بیش‌تر آن با ریشه گیاهان بوده است. نتایج حاصل از سنجش فراهمی فنانترن در خاک در این پژوهش نیز موید این مطلب است.

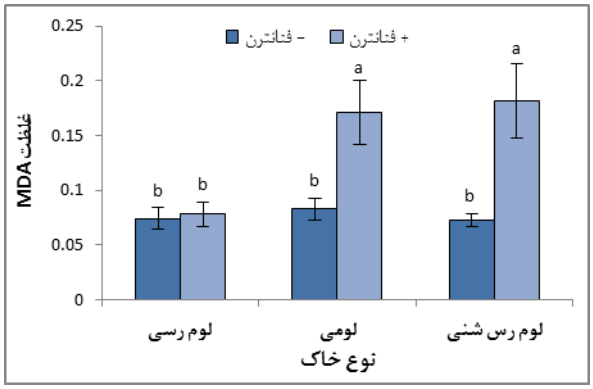
جدول ۱ تاثیر فنانترن بر شاخص‌های رشد گیاه گندم رویش یافته در خاک‌هایی با بافت متفاوت. تفاوت مابین اعداد مربوط به هر شاخص که دارای حروف مشترک می‌باشند از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد (p≤۰/۰۵ و n=۳).

بافت خاک	تیمار فنانترن (mg kg^{-1})	ارتفاع اندام هوائی (cm)	وزن تر اندام هوائی (mg)	وزن تر ریشه (mg)	وزن خشک اندام هوائی (mg)	وزن خشک ریشه (mg)
لوم رسی	شاهد	۲٤/۳۸±۱/٤٤ ^{a}	٥٦۹±۸۰ ^{a}	۷۷±۱۰ ^{b}	۸٦±۷ ^{a}	۱۷±۰/٤ ^{b}
	۵۰	۲۳/٥۹±۲/۰٤ ^{ab}	٤۹٥±۳۱ ^{ab}	۷۱±۱۰ ^{bc}	۸۲±٦ ^{a}	۱۱±۰/۳ ^{c}
لومی	شاهد	۲٥/٥۸±۲/٥۲ ^{a}	٥٥٤±۷۲ ^{ab}	۱٥۸±۱۲ ^{a}	۸۹±٤ ^{a}	۲۸±۰/٤ ^{a}
	۵۰	۲۱/۸۸±۲/۳٤ ^{ab}	٤۱۱±۷۸ ^{b}	٤۹±۹ ^{c}	۸۲±۷ ^{a}	۲/۳±۰/٦ ^{d}
لوم رس شنی	شاهد	۲٥/۷۱±۲/۱٦ ^{a}	۲۳۲±۱۲ ^{c}	۱۱±۲ ^{d}	۳۰±٥ ^{b}	۲/۳±۰/۳ ^{d}
	۵۰	۱۸/٦٦±۱/٥۲ ^{b}	-	–	–	–

مقادیر مربوط به خانه‌هایی از جدول که با علامت – نشان داده شده‌اند، به‌دلیل محدود بودن ماده گیاهی قابل تعیین نبود.

شاخص‌های بیوشیمیائی

غلظت مالون دی‌آلدهید (MDA) در اندام هوائی گیاهان گندم تیمار شده با فنانترن نسبت به شاهد افزایش نشان داد. در گیاهان رویش یافته در خاک لوم رسی و تیمار شده با فنانترن تغییر معنی‌داری در غلظت MDA مشاهده شد (p≤۰/۰۵)، درحالی‌که در گیاهان رویش یافته در خاک لومی و لوم رس شنی به‌ترتیب افزایش معنی‌دار ۲/۱ و ۲/۵ برابری در غلظت MDA اتفاق افتاد (p≤۰/۰۵) (شکل ۲). MDA یک شاخص زیستی برای اندازه‌گیری شدت پراکسیداسیون غشاها می‌باشد [۱۰] و معمولا برای نشان دادن حساسیت گیاهان به تنش اکسیداتیو مورد استفاده قرار می‌گیرد [٤]. بنابراین نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که القای تنش اکسیداتیو یکی از اثرات ثانویه فنانترن می‌باشد که در نهایت باعث کاهش رشد گیاه گندم شده است. انباشت MDA در نتیجه تنش ناشی از PAHs در گیاهان دیگری نظیر *آرابیدوپسیس تالیانا* نیز گزارش شده است [۱۷]. به‌علاوه، حضور فنانترن به‌ویژه در خاک‌های حاوی درصد بالا از شن، باعث انباشت بیشتر MDA گردید. این موضوع نیز حاکی از فراهمی بالای فنانترن در خاک‌های با بافت درشت و در نتیجه دسترسی زیستی بالای آن برای ریشه گیاه گندم، و در نهایت تاثیرات شدیدتر آن می‌باشد.



شکل ۲ تاثیر فنانترن بر غلظت مالون دی‌آلدئید (μmol g^{-1} FW) در اندام هوائی گیاه گندم کشت شده در خاک‌هایی با بافت متفاوت. تفاوت مابین ستون‌هائی که دارای حروف مشترک می‌باشند از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد (p≤۰/۰۵ و n=۳).

تاثیر فنانترن بر غلظت کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل (a + b) بسته به خاک مورد استفاده برای کشت متفاوت بود. غلظت تمام رنگیزه‌های فتوسنتزی در گیاهان شاهد رویش یافته در خاک لومی، در اغلب موارد به صورت معنی‌داری کمتر از گیاهان رویش یافته در خاک لوم رسی بود ($p\leq۰/۰۵$) (جدول ۲). این تغییر به احتمال زیاد به‌دلیل کاهش توان تامین عناصر ضروری گیاهان در خاک حاوی مقادیر بالا از شن می‌باشد. غلظت کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل (a + b) در گیاهان تیمار شده با فنانترن و رویش یافته در خاک لوم رسی به‌ترتیب کاهش معنی‌دار ۵/۳، ۳/۸ و ۶/۰ درصدی نشان داد ($p\leq۰/۰۵$). این درحالی بود که غلظت رنگیزه‌های فوق در گیاهان رویش یافته در خاک لومی، به ترتیب افزایش معنی‌دار ۳۶/۱، ۳۵/۳ و ۳۸/۶ درصدی نشان داد ($p\leq۰/۰۵$) (جدول ۲). غلظت کاروتنوئیدها در گیاهان تیمار شده با فنانترن به شکل معنی‌داری کمتر از گیاهان شاهد بود و با افزایش درصد شن در خاک، این تاثیر بیشتر مشاهده گردید (جدول ۲). کاهش غلظت کاروتنوئیدها در گیاهان تیمار شده با فنانترن و رویش یافته در خاک لوم رسی ۱۷٪ و در گیاهان رویش یافته در لومی ۲۸/۹٪ بود. با توجه به القاء تنش اکسیداتیو توسط تنش ناشی از غلظت‌های بالای PAHs [۱۷] که در این پژوهش نیز با انباشت MDA تائید گردید (شکل ۲)، و هم‌چنین اختلال در عملکرد دستگاه فتوسنتزی توسط این ترکیبات [۷]، کاهش غلظت رنگیزه‌های فتوسنتزی مورد انتظار بود. تاثیری که در گونه‌های دیگر گیاهی نظیر *آرابیدوپسیس تالیانا* نیز گزارش شده است [۱۷]. با وجود این، با توجه به افزایش فراهمی فنانترن در خاک‌های حاوی مقادیر بالاتر از شن که در این تحقیق مشاهده شد (شکل ٤)، انتظار می‌رفت غلظت رنگیزه‌ها در گیاهان تیمار شده با فنانترن و رویش یافته در چنین خاک‌هائی کاهش بیشتری نشان دهد. افزایش غلظت رنگیزه‌های فوق می‌تواند به دلیل تاثیر شدیدتر فنانترن بر کاهش رشد گیاه در مقایسه با غلظت رنگیزه‌ها باشد که در نهایت منجر به غلیظ‌تر شدن رنگیزه‌های فتوسنتزی شده است.

جدول ۲ تاثیر فنانترن بر غلظت رنگیزه‌های فتوسنتزی ($mg\ gr^{-1}\ FW$) گیاه گندم رویش یافته در خاک‌هایی با بافت متفاوت. تفاوت مابین اعداد مربوط به هر شاخص که دارای حروف مشترک می‌باشند از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد ($p\leq۰/۰۵$ و $n=۳$).

	غلظت فنانترن ($mg\ kg^{-1}$)	بافت خاک		
		لوم رسی	لومی	لوم رس شنی
کلروفیل a	شاهد	۱۳/۱ ± ۰/۳ ^{b}	۱۱/۹ ± ۰/۵ ^{c}	۱۲/۵ ± ۰/۱ ^{c}
	۵۰	۱۲/٤ ±۰/۲ ^{c}	۱٦/۲ ± ۰/۳ ^{a}	–
کلروفیل b	شاهد	۵/۳ ± ۰/۲ ^{b}	۵/۱ ± ۰/۲ ^{c}	۵/۳ ± ۰/۸ ^{b}
	۵۰	۵/۱ ± ۰/۱ ^{c}	٦/۹ ± ۰/۱ ^{a}	-
کلروفیل a+b	شاهد	۱۸/۳ ±۰/۲ ^{b}	۱۷/۱ ± ۰/۳ ^{c}	۱/۷ ± ۰/۳ ^{c}
	۵۰	۱۷/۲ ± ۰/۱ ^{c}	۲۳/۷ ± ۰/۳ ^{a}	-
کاروتنوئیدها	شاهد	٤/۷ ± ۰/۳ ^{a}	٤/۵ ± ۰/۲ ^{ab}	۳/۸ ± ۰/۳ ^{bc}
	۵۰	۳/۹ ± ۰/٤ ^{bC}	۳/۲ ± ۰/۱ ^{c}	-

مقادیر مربوط به خانه‌هایی از جدول که با علامت – نشان داده شده‌اند، به‌دلیل محدود بودن ماده گیاهی قابل تعیین نبود.

غلظت فسفر و پتاسیم در اندام هوائی تمام گیاهان با افزایش درصد شن در خاک کاهش نشان داد ولی درصد کاهش در گیاهان تیمار شده با فنانترن بیش‌تر از گیاهان شاهد بود. در گیاهان تیمار شده با فنانترن و رویش یافته در خاک لوم رسی، غلظت فسفر و پتاسیم به ترتیب ۵۲/۵ و ٤۱/۵٪ کمتر از گیاهان شاهد رویش یافته در همان خاک بود. این کاهش در گیاهان رویش یافته در خاک لومی برابر ۸۷/۹ و ٦۰/۸ بود. غلظت فسفر و پتاسیم در گیاهان شاهد رویش یافته در خاک لومی نسبت به گیاهان شاهد رویش یافته در خاک لوم رسی

به ترتیب ۹/٦ و ٤١/١٪ کمتر بود، درحالی‌که در گیاهان تیمار شده با فنانترن این مقدار کاهش به ترتیب ٧٦/٩ و ٦٠/٥٪ بود (جدول ۳). فنانترن غلظت سدیم اندام هوائی را نیز در گندم تحت تاثیر قرار داد. افزایش درصد شن در خاک و هم‌چنین تیمار گیاهان با فنانترن با کاهش غلظت سدیم در گندم همراه بود، ولی در مجموع درصد کاهش این عنصر در مقایسه با فسفر و پتاسیم کمتر بود. نسبت سدیم به پتاسیم در گیاهان گندم رویش یافته در سه نوع خاک مورد مطالعه تقریبا مشابه هم بود، ولی تیمار فنانترن باعث افزایش قابل توجه در این نسبت گردید. نسبت سدیم به پتاسیم در گیاهان شاهد رویش یافته در خاک لوم رسی و لومی حدود ٠/٦ بود در حالی‌که در گیاهان تیمار شده با فنانترن این نسبت‌ها حدود ٠/٨ و ١/٣ به‌دست آمد (جدول ۳). کاهش غلظت فسفر و پتاسیم گیاهان در خاک‌های با بافت درشت‌تر احتمالا به علت کاهش فراهمی آن‌ها به‌دلیل پائین بودن توان خاک در تامین عناصر ضروری برای گیاهان باشد.

فسفر و پتاسیم عناصر ضروری پرمصرف برای گیاهان می‌باشد و کمبود آن‌ها باعث کاهش رشد گیاهان می‌گردد [۱۹]. کاهش غلظت عناصر ضروری پر مصرف در گندم تیمار شده با فنانترن می‌تواند یکی از دلایل عمده کاهش رشد گیاهان در حضور فنانترن باشد. فنانترن باعث آسیب دیدن غشاهای سلولی در گیاهان می‌گردد [۱۷]. این آسیب می‌تواند تعادل تغذیه‌ای گیاهان را دچار مشکل کند و یکی از دلایل احتمالی کاهش جذب عناصر ضروری و در نهایت کاهش غلظت آن‌ها در گیاهان تیمار شده با فنانترن بوده است. افزایش نسبت سدیم به پتاسیم در گیاهان تیمار شده با فنانترن که در این پژوهش مشاهده گردید نیز این موضوع را تائید می‌کند. علاوه بر فسفر و پتاسیم، اختلال در جذب سایر عناصر ضروری در گیاهان تیمار شده با فنانترن نیز محتمل به‌نظر می‌رسد که نیازمند بررسی‌های بیش‌تر می‌باشد.

جدول ۳ تاثیر فنانترن بر غلظت فسفر، پتاسیم و سدیم ($mg\ g^{-1}$ FW) اندام هوائی گیاهان گندم کشت شده در خاکهای با بافت متفاوت. تفاوت مابین ستون‌هائی که دارای حروف مشترک می‌باشند از نظر آماری معنی‌داری نمی‌باشد ($p \leq ٠/٠٥$ و $n=٣$).

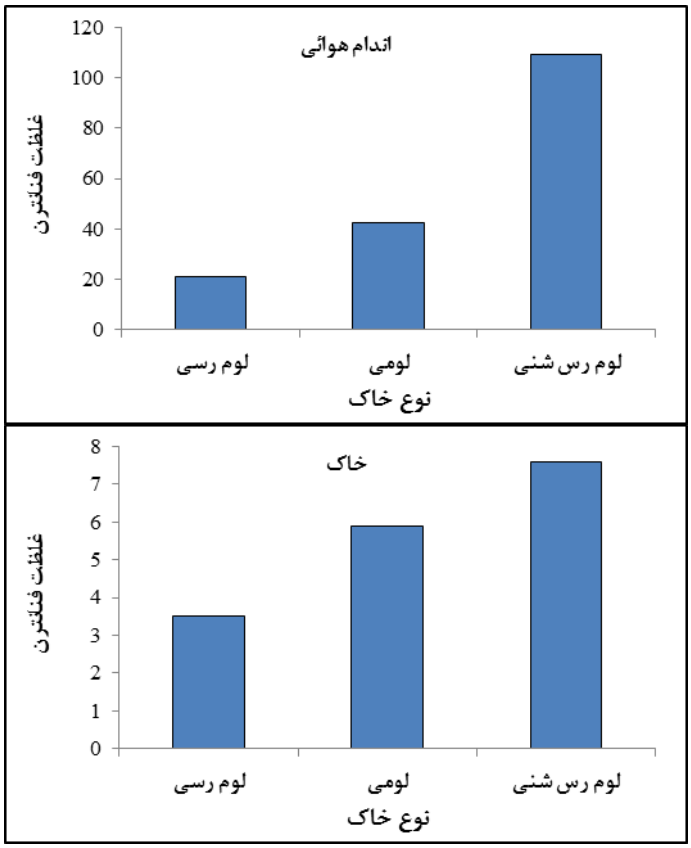
بافت خاک	فنانترن ($mg\ kg^{-1}$)	فسفر	پتاسیم	سدیم	پتاسیم / سدیم
لوم رسی	شاهد	١/١٨ ± ٠/٢٣ ^{a}	٣/١٦ ± ٠/٤٢ ^{a}	١/٨٩ ± ٠/٢٩ ^{a}	٠/٥٩
	٥٠	٠/٥٦ ± ٠/١٣ ^{b}	١/٨٥ ± ٠/٣١ ^{b}	١/٥١ ± ٠/٣٤ ^{ab}	٠/٨١
لومی	شاهد	١/٠٧ ± ٠/١٩ ^{a}	١/٨٦ ± ٠/٢٥ ^{b}	١/١٢ ± ٠/١٨ ^{bc}	٠/٦١
	٥٠	٠/١٣ ± ٠/٠٤ ^{c}	٠/٧٣ ± ٠/١٢ ^{c}	٠/٩١ ± ٠/١٤ ^{bc}	١/٢٥
لوم رس شنی	شاهد	٠/٢ ± ٠/٠٣ ^{bc}	١/٠٢ ± ٠/٢٢ ^{c}	٠/٦٩ ± ٠/٢٣ ^{c}	٠/٦٧
	٥٠	–	–	–	–

مقادیر مربوط به خانه‌هایی از جدول که با علامت – نشان داده شده‌اند، به‌دلیل محدود بودن ماده گیاهی قابل تعیین نبود.

غلظت فنانترن در خاک و گیاه

فراهمی فنانترن در خاک‌های حاوی مقادیر بالاتر از شن افزایش یافت (شکل ۳) به‌طوریکه در خاک لومی و لوم رس شنی به ترتیب ١/٧ و ٢/٢ برابر بیشتر از خاک لوم رسی بود. هم‌چنین فراهمی فنانترن در اندام هوائی گیاهان رویش یافته در خاک حاوی مقادیر بالا از شن به‌صورت قابل توجهی بیش‌تر از گیاهان رویش یافته در خاک حاوی مقدار کم‌تر از شن بود. غلظت فنانترن در گیاهان رویش یافته در خاک لومی و لوم رس شنی به ترتیب ٢/٠١ و ٥/١٨ برابر بیشتر از گیاهان رویش یافته در خاک لوم رسی بود (شکل ۳). فراهمی PAHs در خاک و هم‌چنین جذب آن توسط ریشه گیاهان به عوامل متعددی از جمله خصوصیات فیزیکوشیمیائی خاک بستگی دارد [١٥ و ٢٠]. بخش زیادی از PAHs به سطح ذرات خاک متصل شده و غیر قابل دسترس می گردند [١٢، ١٣ و ٢٦]. خاک حاوی مقادیر بالا از شن دارای سطح مخصوص کمتری نسبت به خاک دارای مقادیر بالا از رس می‌باشد [٦]، از این‌رو توان اتصال فنانترن به ذرات خاک کم‌تر شده و فراهمی زیستی آن بالا می‌رود. از سوی دیگر رویش گیاهان در خاک باعث

تغییر ویژگی‌های آن می‌گردد [۲۸] و این موضوع نیز در فراهمی PAHs در خاک می‌تواند موثر بوده باشد. با توجه به مطابقت نتایج حاصل از سنجش فنانترن در خاک و گیاهان، در مجموع می‌توان گفت که با افزایش مقدار شن در خاک، به‌دلیل کاهش سطح موثر ذرات خاک، میزان جذب سطحی فنانترن در خاک کاهش یافته، فراهمی آن در خاک بالا رفته و نهایتا جذب آن توسط ریشه گیاهان بیشتر شده است. از سوی دیگر این نتایج به‌وضوح نشان می‌دهد که کاهش شدیدتر رشد گیاهان در خاک‌های حاوی مقادیر بالا از شن و تیمار شده با فنانترن، به‌دلیل جذب مقادیر بیش‌تر از فنانترن بوده است.



شکل ۳ فراهمی فنانترن ($\mu g\ kg^{-1}$) در خاک‌های با بافت متفاوت و تیمار شده با $mg\ kg^{-1}$ ۵۰ فنانترن و غلظت آن در اندام هوائی ($ng\ gr^{-1}$) گیاه گندم.

نتیجه‌گیری کلی

تنش ناشی از غلظت بالای فنانترن در خاک باعث کاهش جوانه‌زنی و رشد دانه‌رست‌های گیاه گندم گردید و شدت تاثیرگذاری فنانترن در خاک‌هایی با بافت درشت‌تر و حاوی مقادیر بالا از شن شدیدتر از خاک‌های با بافت ریزتر بود. بالاتر بودن فراهمی فنانترن در خاک حاوی مقادیر بیشتر شن به‌دلیل کاهش جذب سطحی آن بر روی ذرات خاک، و در نتیجه جذب مقادیر بیش‌تر فنانترن توسط ریشه گیاهان و تاثیرگذاری شدیدتر این آلاینده بوده است. اختلال در تغذیه معدنی گیاهان که با کاهش غلظت فسفر و پتاسیم و افزایش نسب سدیم در گیاهان مشخص گردید، هم‌چنین القای تنش اکسیداتیو که با انباشتگی مقادیر MDA مشخص شد از دلایل فیزیولوژیک کاهش رشد گیاهان در خاک‌های آلوده به غلظت‌های بالا از فنانترن بوده است.

منابع

1. Alkio M, Tabuchi TM, Wang X, Colo'n-Carmona A (2005) Stress responses to polycyclic aromatic hydrocarbons in Arabidopsis include growth inhibition and hypersensitive response-like symptoms. *Journal of Experimental Botany* **56**: 2983-2994.
2. Boominathan R, Doran PM (2002) Ni-induced oxidative stress in roots of the Ni hyperaccumulator, *Alyssum bertoloni*. *New Phytologist* **156**: 205-215.
3. Chauhan A, Fazlurrahman, Oakeshott JG, Jain RK (2008) Bacterial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: strategies for bioremediation. *Indian Journal of Microbiology* **48**: 95–113.
4. Debiane D, Garcon G, Verdin A, Fontaine J, Durand R, Grandmougin-Ferjani A, Shirali P, Sahraoui LHA (2008) In vitro evaluation of the oxidative stress and

genotoxic potentials of anthracene on mycorrhizal chicory roots. *Environmental and Experimental Botany* **64**: 120–127.
5. Dere SH, Gunes T, Sivaci R (1998) Spectrophotometric determination of chlorophyll-a, b and total carotenoid contents of some algae species using different solvents. *Journal of Botany* **22**: 13-17.
6. Foth HD (1990) Fundamentals of Soil Science. 8th edition, USA, Jown Viley and Sons Publisher.
7. Huang X, El-Alawi y, Penrose DM, Glick BR, Greenberg BM (2004) Responses of three species to creosote during phytoremediation. *Environment Pollution* **130**: 453-469.
8. Gao Y, Yu XZ, Wu SC, Cheung KC, Tam NFY, Qian PY, Wong MH (2006) Interaction of rice (*Oryza sativa* L.) and PAH-degrading bacteria (*Acinetobacter* sp.) on enhanced dissipation of spiked phenanthrene and pyrene in waterlogged soil. *Science of the Total Environment* **372**: 1-11.
9. Gao Y, Zhu L (2004) Plant uptake, accumulation and translocation of phenanthrene and pyrene in soils. *Chemosphere* **55**: 1169-1178.
10 Gunes A, Pilbeam D, Inal A (2009) Effect of arsenic-phosphorus interaction on arsenic induced oxidative stress in chickpea plants. *Plant and Soil* **314**: 211-220.
11. Jaiswal PC (2004) Soil, Plant and Water Analysis. New Delhi, India, Kalyani Publishers.
12. Jan FA, Khan S, Ishaq M, Naeem M, Ahmad I, Hussain S (2014) Brick kiln exhaust as a source of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the surrounding soil and plants: a case study from the city of Peshawar, Pakistan. *Arabian Journal of Geosciences* **7**: 13-19.
13. Jonsson S, Persson Y, Frankki S, Bavel B, Lundstedt S, Haglund P, Tysklind M (2007) Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in contaminated soils by Fenton's reagent: a multivariate evaluation of the importance of soil characteristics and PAH properties. *Journal of Hazardous Materials* **149**: 86-96.
14. Kipopoulou AM, Manoli E, Samara C (1999) Bioconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetables grown an industrial area. *Environmental Pollution* **106**: 369-380.
15. Khan S, Aijun L, Zhang S, Hu Q, Zhu Y (2008) Accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals in lettuce grown in the soils contaminated with long-term wastewater irrigation. *Journal of Hazardous Materials* **152**: 506–515.
16. Li F, Zeng X, Yang J, Zhou K, Zan Q, Lei A, Tam NFY (2014) Contamination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediments and plants of mangrove swamps in Shenzhen, China. *Marine Pollution Bulletin* **85**: 590-596.
17. Liu H, Weisman D, Yuan-bei Y, Cui B, Huang Y, Colo´n-Carmona A, Wang Z (2008) An oxidative stress response to polycyclic aromatic hydrocarbon exposure is rapid and complex in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* **176**: 375–382.
18. Maila MP, Cloete TE (2002) Germination of *Lepidium sativum* as a method to evaluate polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) removal from contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation* **50**: 107–113.
19. Marschner, H (1995) Mineral Nutrion in Higher Plants. San Diego, USA, Academic Press.
20. Mohan SV, Kisa T, Ohkuma T, Kanaly RA, Shimizu Y (2006) Bioremediation technologies for treatment of PAH-contaminated soil and strategies to enhance process efficiency. *Reviews in Environmental Science Biotechnology* **5**: 347–374.
21. Muller KE, Shann JR (2006) PAH dissipation in spiked soil: Impacts of bioavailability, microbial activity, and trees. *Chemosphere* **64**: 1006-1014.
22. Muratova AY, Kapitonova VV, Chernyshova MP, Turkovsakaya OV (2009) Enzymatic activity of alfalfa in a phenanthrene-contaminated environment. *World Academy of Science, Engineering and Technology* **58**: 569-574.
23. Parrish ZD, White JC, Isleyen M, Gent MPN, Iannucci-Berger W, Eitzer BD, Kelsey JW, Mattina MI (2006) Accumulation of weathered polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by plant and earthworm species. *Chemosphere* **64**: 609–618.
24. Reynoso-Cuevas L, Gallegos-Martı´nez ME, Cruz-Sosa F, Gutie´rrez-Rojas M (2008) In vitro evaluation of germination and growth of five plant species on medium supplemented with hydrocarbons associated with contaminated soils. *Bioresource Technology* **99**: 6379–6385.
25. Singh OV, Jain RK (2003) Phytoremediation of toxic aromatic pollutants from soil. *Applied Microbiology and Biotechnology* **63**: 128–135.
26. Smith MJ, Flowers TH, Duncan HJ, Alder J (2006) Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on germination and subsequent growth of grasses and legumes in freshly contaminated soil and soil with aged PAHs residues. *Environment Pollution* **141**: 519-525.
27. Somtrakoon K, Chuoychai W (2013) Phytotoxicity of single and combined polycyclic aromatic hydrocarbons towards economic crops. *Russian Journal of Plant Physiology* **60**: 139-148.
28. Walker TS, Bais HP, Grotewold E, Vivanco JM (2003) Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiology* **132**: 44-51.
29. Watts AW, Ballestero TP, Gardner KH (2006) Uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in salt marsh plants *Spartina alterniflora* grown in contaminated sediments. *Chemosphere* **62**: 1253-1260.
30. White JC, Kelsey JW, Hatzinger PB, Alexander M (1997) Factors affecting sequestration and bioavailability of phenanthrene in soils. *Environmental Toxicology and Chemistry* **16**: 2040–2045.

Physiological effect of phenanthrene toxicity on wheat plants grown in soils with different texture

Fatemeh Sabonchi Mohammadi [1], Seyed Yahya Salehi-Lisar [1*] and Ahmad Mosen Harzandi [2]

[1] Department of Plant Sciences, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran

[2] Laboratory of Water Analysis, Water and Wastewater Organization, Tabriz, Iran

Abstract

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are diverse organic polutants. Plants could uptake PAHs by roots from soil and/or by shoots from atmosphere. PAHs uptake and effects on plants are dependent on different environmental parameters such as soil physico-chemical properties. In this research, phenanthrene uptake and accumulation and that effects on growth and physiological parameters of wheat plants grown in soils containing 50 mg kg^{-1} of phenanthrene was investigated. In addition, in order to comparison of phenanthrene effects in soils with different texture, plants were cultivated in clay loam, loam and sandy clay loam soils containing phenanthrene for 30 days. Phenanthrene reduced seed germination and seedlings growth of wheat plants specialy in soils containing higher sand content. Phanathrene availabilty and uptake by wheat plants was higher in soils with coarse texture. Phenanthrene led to MDA accumulation, decrease in phosphorus and pottasium concnetrations and lower photosynthetic pigment contents particularly in plants grown in soils with coarse texture. Generally, this research indicated that phenanthren has nefative effets on wheat growth specially in coarse soils with higher sand content. Probably, lower surface absorbtion of phenanthrene on sand particles led to that higher availabilty in siols and, finally, higher uptake and severe effects on wheat plants.

Keywords: Chlorophyll, Malondialdehyde, PAHs, Phosphorus uptake, Soil texture

* Corresponding author, Email: y_salehi@tabrizu.ac.ir