

اثر آلودگی نفتی خاک بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی و مولکولی گیاه

سعیده رجایی^{۱*}، سید مهدی سیدی^۲، فایز رئیسی^۳، بهروز شیران^۳ و مریم معظم جزی^۲

^۱ تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، پژوهشکده صنعت و محیط زیست

^۲ تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، پژوهشکده بیوتکنولوژی گیاهی

^۳ شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، دانشکده کشاورزی

تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۱/۱

تاریخ دریافت: ۹۲/۲/۶

چکیده

تنش‌های غیر زیستی بازدهی گیاه پالایی را به عنوان فناوری سازگار با محیط زیست و مقرون به صرفه در پالایش آلودگی‌های خاک کاهش می‌دهد. هدف از این تحقیق بررسی اثر تنش آلودگی نفتی و مسن خاک (۱۰ درصد وزنی: غلظت کل هیدروکربنهای نفتی) طی فرآیند گیاه پالایی بر دو گونه گراس (جو دوسر وحشی و جو زراعی) بود. به علاوه اثر تلقیح ریزوباکتریهای تجزیه کننده نفت بر تحریک رشد و کاهش سمیت آلاینده های نفتی در خاک آلوده مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج، آلودگی نفتی خاک در هر دو گیاه باعث کاهش شاخصهای رشد، رنگیزه‌های فتوسنتزی و افزایش مقدار پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، MDA (مالون‌دی‌آلدهید) و آنتی‌اکسیدانهای آنزیمی (کاتالاز و پراکسیداز) و همچنین افزایش نسخه‌های ژنهای *NCDE* و *COR2* شد که بیانگر بروز تنش اکسیداتیو در اثر آلودگی نفتی، مشابه با دیگر تنش‌های غیر زنده متداول بود. افزایش نسبت کلروفیل a/b و کاهش شدیدتر وزن خشک اندام هوایی در جو دوسر وحشی نسبت به جو زراعی نشان داد جو زراعی در برابر تنش آلودگی نفتی خاک متحمل تر است. تلقیح باکتریایی باعث کاهش سمیت نفت خام و بهبود رشد گیاه به خصوص در جو دوسر وحشی گردید.

واژه‌های کلیدی: گیاه پالایی، تنش آلودگی نفتی، جو زراعی و جو دوسر وحشی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۴۴۷۸۷۳۰۵، پست الکترونیکی: rajaae.sd@gmail.com

مقدمه

در برابر آلودگی نفتی از خود نشان نمی‌دهند و سطوح واکنش پذیری و تحمل آنها متفاوت می‌باشد (۳۷). گیاهان زراعی مانند ذرت، گندم، یولاف، آفتاب گردان، هویج، کلزا و سویا نسبت به آلودگی نفت خام تا حدی مقاوم گزارش شده‌اند اما این مقاومت از وارسته‌ای به وارسته دیگر متفاوت می‌باشد (۲۴). اطلاعات موجود در زمینه فیزیولوژی، بیولوژی مولکولی و بیوشیمی تنش هیدروکربنهای نفتی بر گیاه بسیار محدود است. به هر حال بسیاری از مسیرهای ترانسسانی علائم در پاسخ به تنش‌های زیستی و حتی غیر زیستی مشترک می‌باشد. پاسخهای اولیه گیاه به تنش‌های

گیاه پالایی فناوری استفاده از گیاهان برای پاکسازی خاکهای آلوده و یا آب می‌باشد. شرط اصلی برای پالایش آلودگی خاک توسط گیاهان توانایی گیاه برای تحمل و رشد تحت شرایط آلوده می‌باشد (۳۷). بیشتر ترکیبات نفتی برای گیاه سمی بوده و باعث کاهش رشد، نمو و بروز تنش در گیاه می‌گردد. گیاهانی که کمتر تحت تأثیر سمیت آلاینده‌ها قرار می‌گیرند در چنین شرایطی سالم‌تر و مقاوم‌تر هستند و با ایجاد سیستم ریشه ای مناسب، رشد و گسترش بیشتری خواهند داشت لذا عملکرد پالایشی سیستم را افزایش می‌دهند (۴۴). گیاهان مختلف پاسخهای یکسانی

چنین شرایطی افزایش پیدا می‌کند (۷) با این وجود اطلاعات کامل‌تری در این زمینه وجود ندارد لذا به منظور شناخت پاسخ گیاهان به آلودگی طولانی مدت نفت خام پژوهش حاضر انجام گرفت. این مطالعه بخشی از یک پروژه گیاه پالایی با استفاده از یک گونه جو دوسر وحشی و یک گونه جو زراعی بود. در طول فصل رشد گیاه اثر آلودگی نفت خام بر رشد، پاسخهای فیزیولوژیک و مولکولی دو گیاه منتخب برای گیاه پالایی بررسی گردید. از آنجایی که در برخی تیمارها تلقیح باکتریایی با ریزوباکتریهای تجزیه‌کننده هیدروکربنهای نفتی صورت گرفته بود، اثر این باکتریها بر رشد گیاه در خاک آلوده همچنین مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

تهیه خاک: خاک آلوده به نفت خام (Silty clay loam) با سابقه طولانی مدت آلودگی (۱۰ درصد وزنی TPH) از میدان نفتی مارون واقع در استان خوزستان جمع‌آوری گردید (جدول ۱). به منظور تیمار شاهد (غیر آلوده)، خاکی با خصوصیات به نسبت مشابه اما غیر آلوده از نزدیکی ناحیه آلوده جمع‌آوری گردید.

جدول ۱ - برخی خصوصیات شیمیایی خاکهای مورد استفاده در آزمون گلخانه

شاخص	خاک غیر آلوده	خاک آلوده
فسفر قابل جذب ($\text{mg kg}^{-1} \text{ soil}$)	۸۹	۱۰۳
نیترژن (%)	۰/۰۲	۰/۱۰
پتاسیم ($\text{mg kg}^{-1} \text{ soil}$)	۱۱۱	۱۲۷
pH در عصاره ۱:۲/۵	۷/۴	۷/۰۱
EC (dSm^{-1}) در عصاره ۱:۲/۵	۱/۲۱	۱/۴۵
مواد آلی (%)	۰/۱۰	-

ژنتیک و زیست‌فناوری تهیه شدند. همچنین جهت تلقیح بذرها از جدایه‌های *Enterobacter*، *Stenotrophomonas*، *Paenibacillus*، *Microbacterium* و *Curtobacterium* سوسپانسیون تهیه و بذور با آن تلقیح گردید (۱، ۱۷ و ۳۸). کشت گلخانه و سنجش شاخصهای فیزیولوژیک در گیاه: آزمایش گلخانه به صورت فاکتوریل (۲×۲) برای دو

خشکی، شوری و سرما (به استثنای جزء یونی در شوری) بسیار مشابه می‌باشد (۱۶). در این شرایط انباشتگی اسمولیت‌های سازگار، فعالیت سیستمهای آنتی‌اکسیدانی و همچنین افزایش غلظت هورمون ABA و تغییر بیان ژنها از مسیرهای وابسته به ABA و مستقل از آن به حفاظت سلولهای گیاهی در برابر اثرات مخرب تنش کمک می‌کند (۲، ۳ و ۸). برخی از محققین معتقدند همانند سایر تنشهای زیستی، نفت و هیدروکربنهای نفتی تشکیل‌دهنده‌های اکسیژن فعال مانند سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و هیدروکسیل (ROS) را در سلولهای گیاهی تحت این تنش القاء می‌نمایند (۲ و ۳۷). علاوه بر شاخص رشد گیاه که عموماً بازگو کننده پاسخ گیاه به تنش می‌باشد، شاخصهای فیزیولوژیک دیگر مانند تغییرات میزان انواع متابولیتهای سلولی شامل انواع رنگیزه‌های فتوسنتزی و غیره ممکن است در برآورد اثر و شدت تنش نفتی مفید باشند. به عنوان مثال Alkio و همکاران مشاهده نمودند که فنانترونی می‌تواند وارد سلول آراییدوپسیس شده و تولید H_2O_2 را افزایش دهد که باعث بروز تنش اکسیداتیو و در نهایت مرگ سلول می‌شود به علاوه در این شرایط بیان ژن PR1 که یک ژن پاسخ‌گر به تنش زیستی پاتوزنی می‌باشد، در

تهیه مایه تلقیح: برای تهیه مایه تلقیح از باکتریهای تجزیه‌کننده نفت خام استفاده شد. این جدایه‌ها شامل *Enterobacter*، *Pseudomonas*، *Acinetobacter*، *Achromobacter*، *Bacillus*، *Stenotrophomonas*، *Microbacterium* و *Curtobacterium* بودند که از بانک پروکاریوتی پژوهشگاه ملی مهندسی

بررسی گردید (۳۹ و ۴۱).

تجزیه و تحلیل آماری: نرمال بودن داده‌ها با آزمون Ryan-Joiner (۵ درصد) و همگن بودن واریانسها با آزمون Levene (۵ درصد) بررسی شد. داده‌ها با نرم افزار SigmaStat 3.5 به روش General Linear Model تجزیه و تحلیل و جدول تجزیه واریانس برای مطالعه اثرات ساده و اثرات متقابل رسم و مقایسه میانگینها به روش Fisher LSD_{0.05} انجام گرفت.

نتایج

شاخصهای رشد گیاه: ارتفاع جو دوسر و جو زراعی تلقیح نشده در خاک آلوده به ترتیب حدود ۴۵ و ۴۷ درصد نسبت به خاک غیر آلوده کاهش یافت. در شرایط تلقیح این کاهش به ترتیب ۳۱ و ۳۳ درصد بود (جدول ۳ و ۴). بر اثر آلودگی نفتی وزن خشک اندام هوایی جو دوسر و جو زراعی به ترتیب ۵۱ و ۵۰ درصد کاهش پیدا کرد و بر اثر تلقیح، وزن خشک اندام هوایی جو دوسر ۲۵ درصد نسبت به خاک آلوده تلقیح نشده بیشتر بود. در خاک آلوده وزن خشک ریشه جو دوسر ۶۸ درصد کاهش یافت و در شرایط تلقیح شده این کاهش به اندازه ۴۰ درصد بود. در خاک آلوده نسبت R/S در گیاه تلقیح شده ۴۰ درصد بیشتر از گیاه تلقیح نشده بود.

بیشتر بودن شاخصهای نسبی رشد گیاه (خاک آلوده به خاک غیر آلوده، شکل ۱ چپ) نشان دهنده رشد بهتر در شرایط تنش می‌باشد. در شرایط تلقیح نشده میزان کاهش وزن خشک هوایی جو دوسر بر اثر تنش نفتی بیشتر از جو زراعی بود که نشان دهنده حساسیت بالاتر جو دوسر به این نوع تنش است.

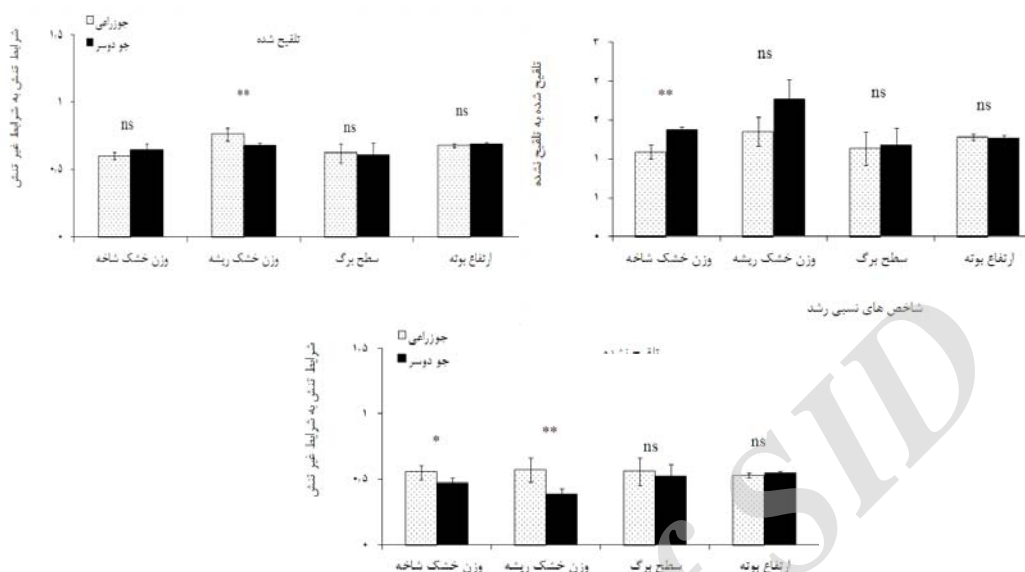
شاخصهای نسبی رشد گیاه در خاک آلوده (شکل ۱، راست) با تقسیم پارامترهای اندازه‌گیری شده گیاه تلقیح شده در خاک آلوده به مقادیر همان پارامترها اما تلقیح نشده به دست آمد. افزایش این نسبت نشانه پاسخ بهتر گیاه

گیاه جو دوسر وحشی (*Avena fatua* L.) و جو زراعی (*Hordeum vulgare* L. variety Afzal) به‌طور جداگانه در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. فاکتور اول شامل آلودگی خاک (آلوده (PS) و غیر آلوده (NPS)) و فاکتور دوم شامل تلقیح باکتریایی (تلقیح شده و تلقیح نشده) بود. به منظور بررسی اثر تنش آلودگی نفتی بر گیاه برخی از مهم ترین شاخصهای فیزیولوژیکی شامل میزان کلروفیل و کاروتنوئید (عصاره گیری با استون و قرائت جذب در طول موجهای مربوطه توسط اسپکتروفوتومتر) (۲۳)، آنتوسیانین (عصاره گیری با متانول اسیدی) (۱۴)، MDA (واکنش عصاره برگ با تیوبایبیتوریک اسید) (۱۲)، پرولین (عصاره گیری با سولفوسالیسیلیک اسید و تولوئن) (۲۸)، هیدروژن پراکسید (عصاره گیری با تری کلرواستیک اسید) (۲۷) و فعالیت آنزیم کاتالاز (اندازه گیری تغییرات جذب عصاره آنزیمی برگ در حضور آب اکسیژنه) (۵) و پراکسیداز (تغییرات جذب عصاره آنزیمی برگ در حضور متانول و آب اکسیژنه) (۴) در گیاهان ۲۸ روزه رشد یافته تحت شرایط تنش مورد بررسی قرار گرفت. پس از گذشت ۴ ماه از رشد گیاه شاخصهای رشد مانند وزن خشک ریشه (R) و بخش هوایی (S)، ارتفاع نهایی بوته‌ها و سطح برگ اندازه گیری گردید.

مطالعه الگوی بیان ژنهای پاسخ‌گر به تنش با استفاده از واکنش RT-PCR: از گیاهان تحت تنش و شاهد (در مرحله دو برگه) RNA کل استخراج و با استفاده از آنزیم Reverse transcriptase (ONE-STEP RT-PCR) (Roche)، cDNA سنتز شد و بیان (مقدار نسخه‌های mRNA) ژن مورد نظر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی این ژنها (جدول ۲) بررسی گردید. شدت باندهای آشکار شده با نرم افزار Total Lab کمی گردید. اثر نوع گیاه و آلودگی نفتی خاک بر میزان نسبی نسخه‌های ژنهای مرتبط که در هر دو گیاه بیان شده بودند به صورت آزمایش فاکتوریل (۲×۲) و در قالب طرح کاملاً تصادفی

دوسر به افزودن مایه تلقیح بهتر از جو زراعی می‌باشد.

به تلقیح می‌باشد. اما فقط نسبت وزن خشک بخش هوایی بین دو گیاه معنی‌دار گردید که نشان می‌دهد پاسخ جو



شکل ۱- چپ: شاخص‌های نسبی رشد در خاک آلوده و غیر آلوده در عدم حضور مایه تلقیح و در حضور مایه تلقیح، راست: اختلاف شاخص‌های نسبی رشد جو دوسر و جو زراعی کشت شده در خاک آلوده، محور Y: میانگین نسبتها (n=5) و خطوط عمودی روی ستونها: انحراف استاندارد، * و **: اختلاف معنی‌دار به ترتیب در سطح ۰/۰۵ و ۰/۰۱، ns: غیر معنی‌دار (آزمون t-test).

جدول ۲ - آغازگرهای اختصاصی واکنش RT-PCR

نام	هدف	منبع
18S	House keeping (همواره بیان می‌شوند)	(۳۹)
<i>KIN2</i>	Cold inducible (پاسخ به تنش‌های غیرزیستی مانند خشکی شوری و سرما)	
RD22	پاسخ به دهیدراسیون (افزایش تحمل تنش خشکی و شوری)	
COR15	Cold regulated (پاسخ به تنش‌های غیرزیستی)	
MYB60	تنظیم منافذ روزنه در پاسخ به تنش‌های محیطی	(۴۱)
P5CS	پیرولین ۵ کربوکسیلات سنتتاز (بیوسنتز پرولین)	
ABI1	(سرین/ترئونین پروتئین فسفاتاز) ترانس‌اسی علامت ABA	
<i>NCED3</i>	۹ سیس اپوکسی کارتنوئید دی اکسیژناز در مسیر بیوسنتز ABA	

در جو دوسر و جو زراعی خاک آلوده به طور معنی‌دار کمتر از خاک غیر آلوده بود (جدول های ۵ و ۷). تلقیح باکتریایی در خاک آلوده باعث افزایش معنی‌دار کاروتنوئیدها در جو دوسر و جو زراعی گردید. بر اثر آلودگی نفتی میزان آنتوسیانین جو زراعی افزایش پیدا کرد (جدول های ۵ و ۷). مقدار پرولین جو دوسر در پاسخ به آلودگی نفتی به طور معنی‌دار افزایش یافت و تلقیح

متابولیتها: در خاک آلوده مقدار کلروفیل a, b و کلروفیل کل گیاه به‌طور معنی‌دار کاهش یافت. مقدار کلروفیل b جو دوسر با تلقیح باکتریایی در خاک آلوده افزایش یافت. نسبت کلروفیل a/b جو دوسر کشت شده در خاک آلوده بیشتر از خاک غیر آلوده بود اما با تلقیح باکتریایی این نسبت در جو دوسر خاک آلوده و غیر آلوده تفاوت معنی‌دار نداشت (جدول های ۵ و ۷). میزان کاروتنوئیدها

پراکسیداز جو دوسر و جو زراعی معنی‌دار شد. بر اثر آلودگی نفتی میزان هیدروژن پراکسید در هر دو گیاه به طور معنی‌دار افزایش یافت (جدول‌های ۶ و ۸).

باکتریایی آن را کاهش داد. آلودگی نفتی باعث افزایش معنی‌دار غلظت MDA گردید و تیمار باکتری موجب کاهش معنی‌دار MDA در جو زراعی گردید ($P \leq 0/06$). اثر اصلی نوع خاک بر فعالیت آنزیمهای کاتالاز و

جدول ۳- اثر آلودگی نفتی خاک و تلقیح باکتریایی بر شاخصهای رشد جو دوسر

R/S	وزن خشک شاخه		سطح برگ	ارتفاع بوته	تیمار
	(mg plant ⁻¹)		(cm ²)	(cm)	
	بدون تلقیح				
	NPS				
۰/۱۰±۰/۰۲۰	۰/۲۲±۰/۰۲ A	۲/۱±۰/۲	۱۱۸/۸±۵/۹	۶۳/۴±۴/۱ A	
۰/۰۹±۰/۰۰۷	۰/۰۷±۰/۰۱ C	۰/۸۳±۰/۲	۶۱/۸±۷/۵	۳۴/۶±۳/۱ C	
	تلقیح باکتری				
	NPS				
۰/۱۱±۰/۰۱۵	۰/۲۵±۰/۰۲ A	۲/۳۰±۰/۳	۱۱۸/۷±۹/۹	۶۳/۴±۳/۶ A	
۰/۱۱±۰/۰۰۹	۰/۱۵±۰/۰۱ B	۱/۳۶±۰/۲	۷۲/۱±۸/۹	۴۳/۸±۲/۷ B	
-	۰/۰۲۱۹	۰/۲۳۳۸	۷/۷۹	۳/۳	LSD _{0.05} (اثرات اصلی)
-	۰/۰۳۱	-	-	۴/۶۷	LSD _{0.05} (خاک × باکتری)

اعداد در هر ستون میانگین هر تیمار (n=5) به همراه انحراف استاندارد می‌باشند.

در هر ستون حروف مشابه کنار میانگینها به معنی عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد. PS: خاک آلوده، NPS: خاک غیر آلوده.

جدول ۴- اثر آلودگی نفتی خاک و تلقیح باکتریایی بر شاخصهای رشد جو زراعی

R/S	وزن خشک شاخه		سطح برگ	ارتفاع بوته	تیمار
	ریشه	(mg plant ⁻¹)	(cm ²)	(cm)	
	بدون تلقیح				
	NPS				
۰/۰۴۶±۰/۰۰۳B	۰/۱۴۰±۰/۰۱	۳/۰۲±۰/۱۸	۱۳۶±۱۰/۸	۶۳/۰±۵/۶ A	
۰/۰۴۰±۰/۰۰۷B	۰/۰۶۰±۰/۰۲	۱/۵۰±۰/۳۵	۷۴±۹/۹	۳۳/۴±۳/۸ C	
	تلقیح باکتری				
	NPS				
۰/۰۴۹±۰/۰۰۱AB	۰/۱۵۰±۰/۰۲	۳/۱۰±۰/۲۱	۱۳۶±۹/۴	۶۳/۴±۳/۳ A	
۰/۰۵۶±۰/۰۰۱A	۰/۰۹۵±۰/۰۲	۱/۷۰±۰/۲۵	۸۳±۸/۲	۴۲/۶±۳/۶ B	
۰/۰۰۶۵	۰/۰۱۶۹	۰/۲۴۹۸	۹/۱۸	۳/۹۹	LSD _{0.05} (اثرات اصلی)
۰/۰۰۹۲	-	-	-	۵/۶۰	LSD _{0.05} (خاک × باکتری)

اعداد در هر ستون میانگین هر تیمار (n=5) به همراه انحراف استاندارد می‌باشند.

در هر ستون حروف مشابه کنار میانگینها به معنی عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد. PS: خاک آلوده، NPS: خاک غیر آلوده.

جدول ۵ - اثر آلودگی نفتی خاک و تلقیح باکتریایی بر شاخصهای متابولیتی جو دوسر

تیمار	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کلروفیل a/b	کاروتنوئید	آنتوسیانین
بدون تلقیح						
NPS	۴/۶۰±۰/۳۶	۲/۶۷±۰/۱۸	۷/۲۸±۰/۵۳	۱/۷۱±۰/۰۵ B	۰/۱۱۰±۰/۰۰ A	۰/۱۰±۰/۰۰۳
PS	۳/۷۱±۰/۱۲	۱/۸۲±۰/۲۸	۵/۵۳±۰/۶۱	۲/۰۴±۰/۱۶ A	۰/۰۵۹±۰/۰۰ C	۰/۱۰±۰/۰۰۷
تلقیح باکتری						
NPS	۴/۰۶±۰/۲۹	۲/۷۵±۰/۰۹	۷/۳۸±۰/۳۸	۱/۶۵±۰/۰۵ B	۰/۱۱۳±۰/۰۱ A	۰/۱۰±۰/۰۰۵
PS	۳/۹۶±۰/۳۳	۲/۲۷±۰/۲۸	۶/۲۳±۰/۶۱	۱/۷۵±۰/۱۰ B	۰/۰۷۸±۰/۰۰ B	۰/۱۰±۰/۰۰۷
LSD _{0.05} (اثرات اصلی)	۰/۳۲۳۵	۰/۲۱۴۲	۰/۵۱۸۳	-	-	-
LSD _{0.05} (خاک × باکتری)	-	-	-	۰/۱۴۹	۰/۰۱۱۷	-

اعداد در هر ستون میانگین هر تیمار (n=5) به همراه انحراف استاندارد می‌باشند، PS: خاک آلوده، NPS: خاک غیر آلوده. در هر ستون حروف مشابه کنار میانگینها به معنی عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد. واحد اندازه‌گیری: mg g⁻¹ dry weight

جدول ۶ - اثر آلودگی نفتی خاک و تلقیح باکتریایی بر شاخصهای متابولیتی جو دوسر

تیمار	پرویلین	MDA	H ₂ O ₂	کاتالاز	پراکسیداز
					(ΔA min ⁻¹ mg ⁻¹ protein)
بدون تلقیح					
NPS	۲/۴۹±۰/۲۹	۰/۰۵۸±۰/۰۰۷	۰/۰۳۵±۰/۰۰۲	۰/۱۷±۰/۰۱	۳/۱۰±۰/۳۹
PS	۳/۶۴±۰/۱۳	۰/۰۸۸±۰/۰۰۸	۰/۰۴۷±۰/۰۰۵	۰/۰۲۹±۰/۰۳	۳/۷۷±۰/۱۸
تلقیح باکتری					
NPS	۲/۴۱±۰/۱۵	۰/۰۵۸±۰/۰۰۲	۰/۰۳۶±۰/۰۰۱	۰/۱۶±۰/۰۲	۳/۱۲±۰/۲۸
PS	۳/۳۵±۰/۱۹	۰/۰۸۹±۰/۰۰۴	۰/۰۴۵±۰/۰۰۲	۰/۰۲۹±۰/۰۳	۳/۷۴±۰/۲۵
LSD _{0.05} (اثرات اصلی)	۰/۱۹۲۹	۰/۰۰۵۹	۰/۰۰۳۳	۰/۰۲۸۴	۰/۰۰۶۴
LSD _{0.05} (خاک × باکتری)	-	-	-	-	-

اعداد در هر ستون میانگین هر تیمار (n=5) به همراه انحراف استاندارد می‌باشند، PS: خاک آلوده، NPS: خاک غیر آلوده. در هر ستون حروف مشابه کنار میانگینها به معنی عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.

جدول ۷ - اثر آلودگی نفتی خاک و تلقیح باکتریایی بر شاخصهای متابولیتی جو زراعی

تیمار	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کلروفیل a/b	کاروتنوئید	آنتوسیانین
بدون تلقیح						
NPS	۴/۴۶±۰/۲۴	۱/۷۱±۰/۱۱	۶/۱۷±۰/۳۱	۲/۶۱±۰/۱۷	۰/۰۴۵±۰/۰۰۴A	۰/۰۸±۰/۰۰۲
PS	۳/۵۸±۰/۲۱	۱/۳۱±۰/۲۵	۴/۹۰±۰/۲۱	۲/۸۱±۰/۶۳	۰/۰۳۰±۰/۰۰۶B	۰/۱۰±۰/۰۰۵
تلقیح باکتری						
NPS	۴/۵۲±۰/۲۳	۱/۶۹±۰/۱۷	۶/۲۱±۰/۳۸	۲/۶۸±۰/۲۰	۰/۰۴۵±۰/۰۰۷A	۰/۰۸±۰/۰۰۳
PS	۳/۶۹±۰/۳۷	۱/۴۰±۰/۱۲	۵/۱۰±۰/۳۳	۲/۶۵±۰/۴۶	۰/۰۴۱±۰/۰۰۳A	۰/۱۰±۰/۰۰۴
LSD _{0.05} (اثرات اصلی)	۰/۲۵۹۵	۰/۱۶۹۲	۰/۳۰۴۵	-	-	۰/۰۰۴
LSD _{0.05} (خاک × باکتری)	-	-	-	-	۰/۰۰۹۴	-

اعداد در هر ستون میانگین هر تیمار (n=5) به همراه انحراف استاندارد می‌باشند، PS: خاک آلوده، NPS: خاک غیر آلوده. در هر ستون حروف مشابه کنار میانگینها به معنی عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد. واحد اندازه‌گیری: mg g⁻¹ dry weight

جدول ۸ - اثر آلودگی نفتی خاک و تلقیح باکتریایی بر شاخصهای متابولیتی جو زراعی

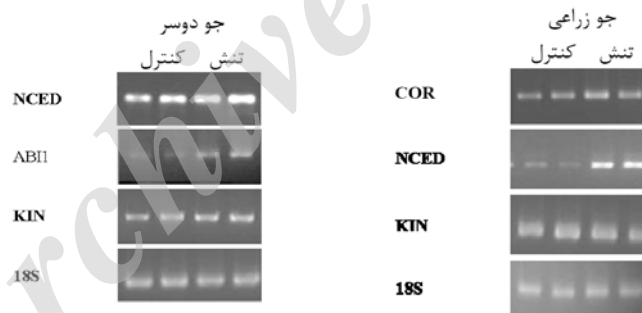
تیماز	پرویلین	MDA	H ₂ O ₂	کاتالاز	پراکسیداز
		(mg g ⁻¹ dry weight)			(ΔA min ⁻¹ mg ⁻¹ protein)
بدون تلقیح					
NPS	۱/۸۳±۰/۴۳	۰/۱۱±۰/۰۱	۰/۰۰۷±۰/۰۰۱	۰/۱۸±۰/۰۱	۳/۱±۰/۲۳
PS	۲/۱۸±۰/۳۹	۰/۱۶±۰/۰۱	۰/۰۰۹±۰/۰۰۱	۰/۲۶±۰/۰۲	۴/۳±۰/۲۷
تلقیح باکتری					
NPS	۱/۸۳±۰/۴۳	۰/۱۱±۰/۰۱	۰/۰۰۷±۰/۰۰۱	۰/۱۸±۰/۰۲	۳/۰±۰/۱۹
PS	۲/۱۲±۰/۵۲	۰/۱۴±۰/۰۱	۰/۰۰۸±۰/۰۰۰	۰/۲۶±۰/۰۳	۴/۳±۰/۴۹
LSD _{0.05} (اثرات اصلی)	-	۰/۰۱۳۳	۰/۰۰۱۲	۰/۰۲۳۲	۰/۳۰۳۷
LSD _{0.05} (خاک × باکتری)	-	-	-	-	-

اعداد در هر ستون میانگین هر تیمار (n=5) به همراه انحراف استاندارد می‌باشند، PS: خاک آلوده، NPS: خاک غیر آلوده.

در هر ستون حروف مشابه کنار میانگینها به معنی عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.

میزان رونویسی ژن *KIN* تقریباً در گیاهان شاهد و تیمار شده مشابه بود. همچنین میزان بیان ژنهای *NCED* و *ABI1* در جو دوسر تحت تنش آلودگی نفتی، نسبت به شاهد افزایش یافت. بیان ژن *KIN* در جو دوسر در حالت کنترل تقریباً مشابه با شرایط تنش بود (شکل ۲).

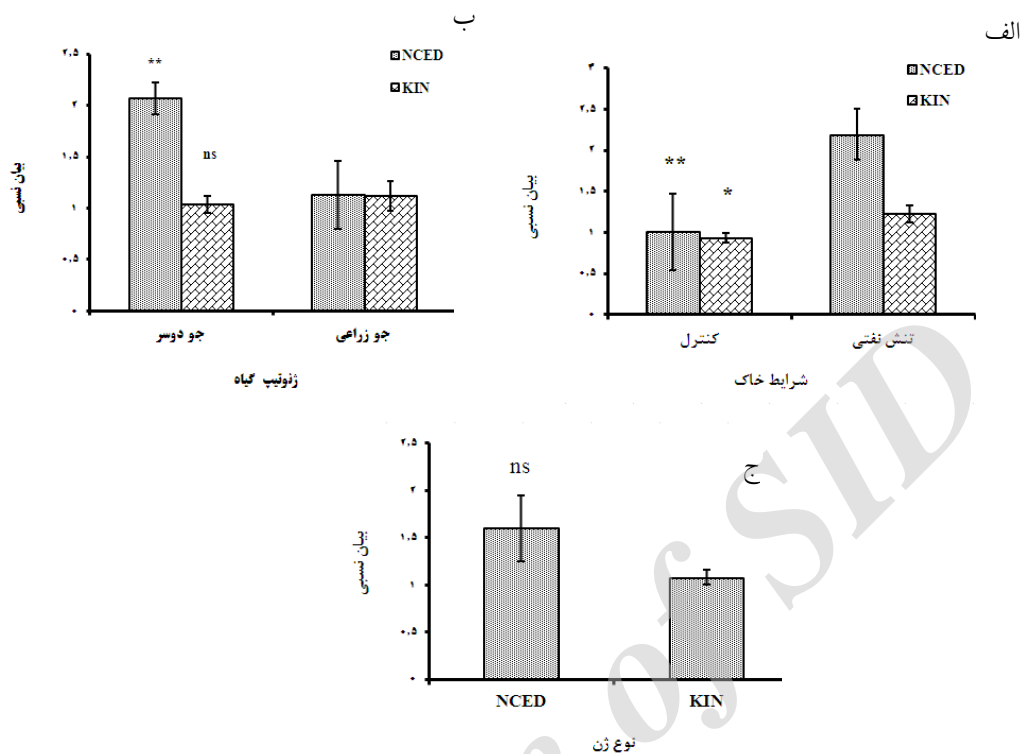
تفاده RT-PCR: از بین ژنهای مورد نظر در بررسی الگوی بیان ژن (۸ ژن، جدول ۲) باندهای مورد نظر فقط برای *KIN*، *COR*، *NCED* و *ABI1* در واکنش RT-PCR به دست آمد. الکتروفورز محصولات نشان داد که میزان نسخه‌های *NCED* و *COR* در جو زراعی تحت تنش آلودگی نفتی نسبت به شاهد (غیر آلوده) افزایش یافت اما



شکل ۲- الکتروفورز محصولات واکنش RT-PCR جو زراعی و جو دوسر در پاسخ به تنش آلودگی نفت خام، در هر شکل از راست چاهک اول و دوم گیاه کشت شده در خاک آلوده به نفت خام با آلودگی ۱۰ درصد و چاهک سوم و چهارم گیاه کنترل غیر آلوده

نسخه‌های ژن *NCED* در سطح ۵ درصد معنی‌دار شد به طوری که بیان این ژن در جو دوسر بیشتر از جو زراعی بود اما اثر نوع گیاه بر میزان نسخه‌های ژن *KIN* معنی‌دار نشد (شکل ۳ ب). اثر متقابل نوع گیاه و نوع خاک بر میزان نسخه‌های این دو ژن معنی‌دار نبود. بین میزان نسخه‌های

نتیجه تجزیه واریانس اثر نوع خاک و نوع گیاه بر میزان نسخه‌های ژنهای *NCED* و *KIN* که به صورت مشترک در هر دو گیاه بیان شدند نشان داد آلودگی نفتی خاک به عنوان یک تنش غیر زیستی باعث افزایش معنی‌دار نسخه‌های ژن *NCED* (سطح ۵ درصد) و *KIN* (سطح ۱۰ درصد) شد (شکل ۳ الف). اثر اصلی نوع گیاه بر میزان

ژن *NCED* و *KIN* اختلاف معنی‌دار وجود نداشت (شکل ۳ ج).

شکل ۳ - مقایسه بیان نسبی ژنهای *NCED* و *KIN* در جو دوسر و جو زراعی بر اثر آلودگی نفتی خاک، * و **: اختلاف معنی‌دار به ترتیب در سطح ۰/۱ و ۰/۰۵، ns: غیر معنی‌دار، الف و ب: نتایج مقایسه میانگین اثرات اصلی تیمار نوع گیاه (جو دوسر و جو زراعی) و نوع خاک (آلوده و غیر آلوده) بر رونویسی (اثر متقابل نوع گیاه و نوع خاک بر میزان نسخه‌ها معنی‌دار نبود)، ج: مقایسه میزان نسخه‌های دو ژن، بارهای روی ستونها: انحراف استاندارد (n=2)، (T *NCED* & *KIN*=0.61 ns).

بحث

گزارش Merkl و همکاران علاوه بر تأخیر در رشد، توده زنده بخش هوایی و ارتفاع بوته نیز در گراسها و لگومهای کشت شده در یک خاک آلوده (۵ درصد وزنی نفت خام) به طور معنی‌دار کاهش یافت و لگومها بعد از ۶ هفته کاملاً از بین رفتند (۳۲) همچنین Liste و همکاران بیش از ۵۰ درصد کاهش عملکرد شاخه و ریشه چاودار در آلودگی به نفت سبک را مشاهده کردند (۲۴). در مطالعه حاضر نیز ۵۰ درصد کاهش توده زنده هوایی برای جو دوسر و جو زراعی ناشی از آلودگی نفتی با غلظت ۱۰ درصد مشاهده گردید. همچنین ارتفاع و سطح برگ دو گیاه ۴۵ درصد و ۴۳ درصد (جو دوسر) و ۴۷ درصد و ۴۲ درصد (جو زراعی) کاهش یافتند. به گزارش Tesar و همکاران کاهش توده زنده چاودار در خاک آلوده به گازوئیل تازه در

شاخصهای رشد گیاه: یکی از اولین پاسخهای گیاهان به تنش کاهش میزان رشد می باشد. در مطالعه حاضر کاهش شاخصهای رشد مانند سطح برگ، ارتفاع بوته، وزن خشک اندام هوایی و وزن خشک ریشه گیاهان کشت شده در خاک آلوده با غلظت ۱۰TPH درصد نشان داد که آلودگی نفتی باعث کاهش قابل توجه رشد می‌گردد. با این حال هر دو گیاه قادر به ادامه حیات به طور کامل طی یک فصل رشد بودند. Martia و همکاران نیز گزارش دادند که طول ریشه و ارتفاع یونجه در حضور آلودگی نفتی ناشی از لجن پالایشگاه نفت با غلظت ۵ درصد TPH کاهش یافت، با این حال گیاه سالم و قادر به ادامه حیات بود (۳۰). به

Mishra و Nautiyal طول ریشه، ساقه و وزن خشک گیاه نخود در خاک آلوده به نفت کاهش یافت ولی افزودن مایه تلقیح به خاک آلوده باعث بهبود وضعیت رشد گیاه گردید (۳۵). Alarcon و همکاران گزارش دادند که در حضور باکتریهای تجزیه کننده هیدروکربنهای نفتی و قارچهای میکوریز شاخص سطح برگ و وزن خشک اندام گیاهی افزایش پیدا کرد (۶). Escalante و همکاران مشاهده کردند که توده زنده ریشه گیاهان تلقیح شده تحت تنش نفتی در مقایسه با گیاهان تلقیح نشده ۱/۶ برابر افزایش پیدا نمود (۱۵). استراتژی برخی گیاهان متحمل به تنش نفتی مانند فسکیو، رشد آهسته بخش هوایی و رشد سریع ریشه است که باعث محدودیت انتقال آلاینده‌ها از ریشه به بخش هوایی می‌گردد. در این حالت آلاینده‌ها در ریشه نگهداری شده و انتقال آب و عناصر غذایی به گیاه بیشتر خواهد بود که نوعی روش مقابله با تنش می‌باشد (۱۹). به گزارش Nie و همکاران و Merkl و همکاران در خاک آلوده به نفت نسبت R/S گیاه افزایش می‌یابد که نشان دهنده توسعه بخش زمینی گیاه در این شرایط و نوعی استراتژی مقابله با آلودگی می‌باشد (۳۳ و ۳۶). در مطالعه حاضر تغییرات نسبت R/S هیچ‌یک از دو گیاه در خاک آلوده معنی‌دار نشد که نشان می‌دهد جو دوسر و جو زراعی استراتژی افزایش رشد ریشه را در این شرایط به عنوان یک مکانیسم سازگاری نداشتند. با این وجود در خاک آلوده تلقیح شده نسبت R/S جو زراعی افزایش یافت لذا به نظر می‌رسد که این افزایش ارتباطی به سیستم دفاعی گیاه ندارد و احتمالاً ناشی از افزایش رشد ریشه بر اثر تلقیح باکتریایی می‌باشد. به هر حال افزایش نسبت R/S ناشی از پاسخ دفاعی گیاه یا تأثیر ریزجانداران می‌تواند باعث افزایش جریان کربن به ناحیه ریشه و ریزوسفر گردد که در تغییر جریان کربن برای گیاه‌پالایی بسیار مهم است. به عقیده Merkl و همکاران افزایش R/S ناشی از تلقیح، به علت رقابت بین ریشه و باکتریهای مایه تلقیح برای دستیابی به عناصر غذایی و اکسیژن می‌باشد. وجود یک

غلظت‌های ۵ درصد و ۱۰ درصد بین ۳۷ تا ۵۵ درصد بود (۴۳). کاهش رشد گیاه می‌تواند ناشی از ترکیبات سمی نفت خام باشد که توسط گیاه جذب شده و با کاهش یکپارچگی غشاء سلولی باعث مرگ سلول می‌شود. از طرف دیگر تغییر خصوصیات خاک بر اثر ماهیت هیدروکربنهای نفتی می‌تواند باعث کاهش رشد گیاه گردد (۳۱).

مهم‌ترین فاکتور مورد توجه در گیاه‌پالایی تولید زیست توده انبوه می‌باشد و هر عاملی که به افزایش آن کمک نماید به طور قطع باعث بهبود و تسریع فرآیند گیاه‌پالایی خواهد شد (۱۹). در این پژوهش توده زنده ریشه و شاخه جو دوسر کشت شده در خاک آلوده تلقیح شده به ترتیب حدود ۱۱۴ و ۶۴ درصد نسبت به گیاه تلقیح نشده افزایش پیدا کرد اما در خاک غیر آلوده چنین روندی مشاهده نشد. از طرف دیگر افزایش رشد ناشی از تلقیح در جو زراعی معنی‌دار نبود. این نتایج نشان می‌دهد که تأثیر تلقیح باکتریایی بر رشد گیاه در خاک آلوده بیشتر از خاک غیر آلوده می‌باشد. از آنجایی که باکتریهای مایه تلقیح بر اساس دارا بودن پتانسیل تجزیه کنندگی نفت برای تهیه مایه تلقیح انتخاب شدند و اثر آنها بر رشد گیاه در خاک غیر آلوده معنی‌دار نبود، به نظر می‌رسد نقش عمده باکتریهای مایه تلقیح در بهبود رشد گیاه در خاک آلوده، کاهش اثر سمیت و تنش ناشی از آلودگی نفتی بر گیاه است تا تحریک مستقیم رشد گیاه. همچنین به نظر می‌رسد که نیاز گیاه و باکتریها به یکدیگر در خاک آلوده بیشتر از خاک غیر آلوده می‌باشد. از طرف دیگر Huang و همکاران عنوان کردند که باکتریهای محرک رشد گیاه در ناحیه ریشه با سنتز ACC-دآمیناز و کاهش سطح اتیلن در گیاه باعث افزایش قدرت جوانه زنی، جلوگیری از کاهش رشد ریشه و افزایش قدرت بقای گیاه تحت تنش می‌گردند. باکتریهای محرک رشد گیاه به حفظ کلروفیل برگ، افزایش آب بافت و رشد ریشه کمک نموده و باعث فراهم آمدن زیست توده انبوه جهت زیست‌پالایی می‌گردند (۱۹). به گزارش

چنین جدایه‌هایی می‌تواند نشان دهنده سابقه سازگاری طولانی این گیاه با چنین جدایه‌هایی باشد و حتی این همکاری را به یک همکاری مفید دو طرفه برای بقا تحت چنین شرایطی در خاک تبدیل نماید.

متابولیت‌های گیاهی: کلروفیل: یکی از اثرات منفی آلاینده‌های نفتی بر گیاه کاهش پیگمانهای فتوسنتزی است (۳۰). بر اثر آلودگی نفتی مقدار انواع کلروفیل در هر دو گیاه کاهش پیدا کرد. تغییرات نسبت کلروفیل a/b بین تیمارهای جو دوسر در خاک آلوده بیشتر از خاک غیر آلوده بود. بر خلاف نتایج به دست آمده در این بررسی Ilangovan و Vivekanandan گزارش دادند آبیاری خاک با آب آلوده به پسابهای نفتی باعث کاهش کلروفیل a و کلروفیل کل گردید. اما کلروفیل b تغییر چندانی نشان نداد و این امر باعث کاهش نسبت کلروفیل a/b در گیاهان خاک‌های آلوده شد (۲۰). در پژوهش دیگری Huang و همکاران گزارش دادند تحت تنش آلودگی کروژوت این نسبت به عنوان حساسیت و پاسخ دفاعی گیاه افزایش یافت (۱۹). با توجه به نتایج این مطالعه، ممکن است بتوان این گونه برداشت نمود که جو زراعی تحت بررسی در این آزمایش نسبت به جو دوسر مقاومت بیشتری در برابر آلودگی هیدروکربنهای نفتی دارد. از سوی دیگر بر اساس شاخصهای نسبی رشد حساسیت جو دوسر وحشی به آلودگی خاک بیشتر بوده و وزن خشک اندام هوایی این گیاه کاهش بیشتری نشان می‌دهد. Huang و همکاران همچنین گزارش کردند که در حضور باکتریهای محرک رشد گیاه نسبت کلروفیل a/b افزایش معنی‌دار نیافت (۱۹) که با نتایج به دست آمده برای جو دوسر در این پژوهش کاملاً مطابقت دارد، به طوری که در جو دوسر تلقیح شده مقدار کلروفیل b افزایش و نسبت کلروفیل a/b کاهش یافت. به گزارش Mishra و Nautiyal نیز با افزایش غلظت گازوئیل خاک میزان کلروفیل کل در برگهای نخود کاهش اما در حضور مایه تلقیح (*Trichoderma reesei*) مقدار کلروفیل ۵۰ درصد افزایش یافت (۳۵).

رابطه متقابل مفید بین گیاه و ریزجانداران ممکن است تجزیه نفت را تسریع کند (۳۳). از طرف دیگر Vavrek و همکاران گزارش دادند باکتریها عملکرد گیاه را کاهش داده و رقابت بر سر عناصر غذایی باعث ایجاد یک رابطه متقابل منفی گردید (۴۶). بنابراین بررسی وضعیت عناصر غذایی خاک قبل از اجرای برنامه زیست‌پالایی و آگاهی از رابطه بیولوژیکی بین اجزاء سیستم ضروری به نظر می‌رسد.

به گزارش Zhang و همکاران آلودگی نفتی در برخی گیاهان به خصوص گونه‌های مقاوم‌تر تنها باعث کاهش رشد می‌شود اما در گیاه مانگروو (*Bruguiera gymnorrhiza*) علاوه بر کاهش رشد باعث بروز برخی پاسخهای فیزیولوژیک نیز گردید (۴۹). در پژوهش حاضر نیز آلودگی نفت خام در خاک هم باعث کاهش رشد، و هم بروز پاسخهای فیزیولوژیک گردید و به نظر نمی‌رسد بروز چنین پاسخهایی به تنهایی ناشی از سمیت نفت خام باشد، زیرا بیشتر ترکیبات به شدت سمی نفت خام فرار بوده و با گذشت زمان تبخیر شده که سمیت آنها نسبت به نفت خام تازه تا حدی کاهش می‌یابد. به طور عمده کاهش عملکرد در این خاکها به شرایط نامناسب فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیک خاک نسبت داده می‌شود. دستورزی خاک منجر به تخریب خاکدانه‌ها شده و عوارض تخریب ساختمان در خاکهای آلوده به نفت به علت ماهیت آب‌گریزی این آلاینده شدیدتر از خاکهای دیگر می‌باشد. ماهیت آب‌گریز نفت خام باعث افزایش مقاومت برشی خاک شده و نفوذ ریشه را در این خاکها با مشکل مواجه می‌نماید، همچنین راندمان انتقال آب و املاح را در این خاکها در مقایسه با خاکهای غیر آلوده کاهش می‌دهد (۴۰).

بر اساس نتایج شاخصهای نسبی رشد پاسخ جو دوسر به تلقیح باکتریایی بیشتر از جو زراعی بود. از آنجایی که منبع تهیه بیشتر جدایه‌های مایه تلقیح باکتریهای بومی ریشه و ریزوسفر گراسهایی بودند که در خاک آلوده به نفت رشد کرده بودند. عملکرد بهتر جو دوسر وحشی نسبت به تلقیح

عنوان شاخص بیوشیمیایی هشدار دهنده آلودگی در گیاه در آینده مطرح گردد (۱۱). در مطالعه حاضر مقدار آنتوسیانین در جو دوسر تحت تیمارهای مختلف اختلافی وجود نداشت، در حالی که میزان این پیگمان در جو زراعی کشت شده در خاک آلوده بیشتر از خاک غیر آلوده بود. Chupakhina و Maslennikov ۲/۵ برابر افزایش آنتوسیانین ناشی از آلودگی نفتی را در جو، ذرت، ماش و برخی از علفهای هرز مشاهده نمودند و آن را به عنوان شاخص میزان آلودگی عنوان کردند که می‌تواند ابزار مفیدی برای تعیین سریع میزان آلودگی و پایش اکولوژیکی جوامع گیاهی باشد (۹) از این رو می‌توان گفت که افزایش میزان آنتوسیانین در جو زراعی حاکی از وجود تنش در محیط و همچنین مقابله گیاه با این شرایط می‌باشد. افزایش میزان آنتوسیانینها همراه با افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در جو زراعی نشان می‌دهد که مقادیر زیادی از H_2O_2 تشکیل شده وارد واکنش شده که در آنجا توسط سیستم فنولیک پراکسیداز تجزیه می‌شود. به هر حال با توجه به محل انباشتگی آنتوسیانینها در واکنشها، این پیگمانها نقش محوری و مهم در روبش انواع اکسیژن فعال دارند (۱۴).

پرویلین: پرویلین یکی از مهم‌ترین اسمولیت‌های سازگار است که میزان آن در گیاهان مختلف در پاسخ به تنشهای متفاوت افزایش می‌یابد (۲). در مطالعه حاضر میزان پرویلین در جو دوسر وحشی تحت تنش نفتی افزایش یافت ولی تغییرات آن در تیمارهای مختلف جو زراعی معنی‌دار نبود. Alarcon و همکاران نشان دادند در حضور نفت خام سنگین تازه (غلظت ۰/۶ درصد) مقدار پرویلین در گیاه چاودار افزایش یافت در حالی که با حضور باکتریهای تجزیه کننده نفت و قارچهای میکوریز غلظت پرویلین کاهش یافت (۳). در مطالعه حاضر نیز مقدار پرویلین در جو دوسر تلقیح شده به طور معنی‌داری کمتر از گیاه تلقیح نشده بود. در تطابق با این نتیجه Alarcon و همکاران انباشتگی پرویلین در حضور آلاینده‌های نفتی را شبیه تنش

کاروتنوئید: کاروتنوئیدها از دیگر رنگیزه‌های فتوسنتزی هستند که در حفاظت نوری گیاه در مقابل انواع اکسیژن فعال در طی فتوسنتز و در پایداری و تمامیت و استحکام غشای لیپیدی نقش دارند (۲۱ و ۲۶). محتوای کاروتنوئید هر دو گیاه بر اثر آلودگی خاک کاهش یافت. محتوای کاروتنوئید گیاهان کشت شده در خاک آلوده تلقیح شده نسبت به گیاهان تلقیح نشده بیشتر بود. Ilangovan و Vivekanandan گزارش دادند بر اثر آبیاری خاک با آب آلوده به نفت محتوای کاروتنوئید برگ روناس ۲۰ درصد کاهش یافت (۲۰). آبسزیک اسید (ABA) یکی از هورمون اصلی در مسیر پاسخ به تنشهای غیرزیستی می‌باشد. آنزیم ۹-سیس آپوکسی کاروتنوئید دی‌اکسیژناز که توسط ژن *NCED* رمز می‌گردد در تبدیل کاروتنوئید به ABA نقش دارد که مهم‌ترین مرحله بیوسنتز ABA می‌باشد. در خاک آلوده میزان نسخه‌های ژن *NCED* در واکنش RT-PCR هر دو گیاه افزایش پیدا کرد. در گیاه آراییدوپسیس نیز در پاسخ به تنش خشکی افزایش نسخه‌های *NCDE* در گزارش شد (۱۳). افزایش نسخه‌های *NCDE* می‌تواند موجب افزایش بیوسنتز ABA شود. از این رو، کاهش میزان کاروتنوئیدها در گیاهان کشت شده در خاک آلوده احتمالاً ناشی از تجزیه آن برای تبدیل به ABA در تنش نفتی می‌باشد.

آنتوسیانین: بسیاری از تنشهای محیطی نظیر خشکی، شوری، نور، دما، کمبود عناصر غذایی و فلزات سنگین موجب افزایش بیوسنتز و انباشتگی آنتوسیانینها می‌شوند (۱۸ و ۳۴). بر خلاف سایر ترکیبات فنولی گیاهی تأثیر آلودگی نفتی روی سنتز آنتوسیانین به طور دقیق مطالعه نشده‌است. بررسیها نشان داده که آنتوسیانینها در شرایط تنش همانند آنتی‌اکسیدان عمل کرده و موجب روبش رادیکالهای آزاد اکسیژن و کاهش پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی می‌گردند (۹، ۱۰ و ۴۲). به عقیده Chupakhina و Maslennikov این متابولیت ثانویه همچنین می‌تواند به

آلودگی ۱ درصد نفت خام خاک ۱۲/۴ درصد MDA را در سویا افزایش داد اما تأثیر معنی‌دار بر کاهش رشد نداشت و هنگامی که غلظت نفت ۵-۳ درصد رسید کاهش معنی‌دار در بخش هوایی و ریشه، ارتفاع و جوانه زنی مشاهده گردید. در تحقیق حاضر در غلظت ۱۰ درصد TPH هم کاهش معنی‌دار رشد و افزایش غلظت MDA به خوبی در هر دو گیاه مشاهده گردید (۲۲). به هر حال افزایش MDA به عنوان کاهش تمامیت غشای سلولی ممکن است منجر به اختلال در نقل و انتقال کلیه مواد و عناصر معدنی در عرض غشای پلاسمایی می‌گردند لذا مطالعه انتقال مواد در عرض غشای پلاسمایی و بررسی غلظت آنها در درون و بیرون از گیاه در حضور آلودگی نفتی می‌تواند به درک آثار ناشی از تنش نفتی بر تعادل عناصر غذایی درون گیاه کمک کند.

آنتی اکسیدانهای آنزیمی: آنزیمهای کاتالاز و پراکسیداز جز مهم‌ترین آنتی‌اکسیدانهای آنزیمی هستند که در جهت تحمل گیاه به تنش اکسایشی نقش عمده ای ایفاء می‌نمایند (۴۷). در مطالعه حاضر آلودگی نفتی فعالیت آنزیمهای کاتالاز و پراکسیداز را در هر دو گیاه افزایش داد که نشان دهنده افزایش انواع اکسیژن فعال و بروز تنش اکسیداتیو در گیاه می‌باشد. در تطابق با این نتیجه Zhangn و همکاران نیز گزارش دادند که آلودگی هیدروکربنهای نفتی موجب افزایش فعالیت آنزیمهای کاتالاز و پراکسیداز در گیاه گردید که به عنوان یک سیستم دفاعی گیاه در مقابله با آسیبهای ناشی از این نوع تنش می‌باشد (۴۹). Martia و همکاران نیز گزارش نمودند فعالیت آنزیم پراکسیداز در برگ یونجه کشت شده در لجن نفتی افزایش یافت. از سوی دیگر افزایش فعالیت سیستم آنتی اکسیدانی به نوع گیاه، شدت و نوع تنش نیز بستگی دارد. به هر حال افزایش انواع فعال اکسیژن علاوه بر اینکه نشان دهنده بروز تنش اکسایشی در گیاه هستند می‌توانند به عنوان یک مولکول پیام رسان در گیاهان تحت تنش عمل کنند و گیاه را از وضعیت فعلی آگاه نمایند لذا نباید انتظار داشت که

خشکی و شوری گزارش و نشان دادند که گیاه تلقیح شده به میزان کمتری تحت تأثیر تنش القاء شده توسط نفت خام قرار می‌گیرد (۶). جمعیت‌های میکروبی موجود در ریزوسفر سازگاری گیاه به آلودگیهای نفتی را از طریق سمیت زدایی این مواد افزایش می‌دهند. به هر حال افزایش میزان پرولین تنها در جو دوسر معنی‌دار شد ولی اینکه این انباشتگی نشانه‌ای از آسیب ناشی از هیدرولیز پروتئینها باشد یا پاسخی در جهت تحمل تنش توسط گیاه هنوز مشخص نیست. همچنین Alarcon و همکاران گزارش کردند که پرولین شاخص مفیدی برای بررسی نحوه پاسخ گیاه به تنش حاصل از آلودگیهای نفتی نمی‌باشد، زیرا این شاخص تحت تأثیر عوامل دیگری مانند حاصلخیزی خاک دستخوش تغییر می‌گردد (۲ و ۶).

محتوای H_2O_2 و پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء: H_2O_2

یکی از انواع اکسیژن فعال تولید شده تحت تنشهای غیر زیستی است که باعث پراکسایش لیپیدها می‌شود و همراه با تولید MDA است که شاخص پراکسایش لیپیدی است (۳۵). به موازات افزایش محتوای H_2O_2 در گیاهان کشت شده در خاک آلوده میزان MDA نیز افزایش یافت و به موازات کاهش محتوای H_2O_2 جو زراعی که تلقیح شده بود، MDA نیز به طور معنی‌دار نسبت کاهش نشان داد. افزایش مقدار MDA کاهش شاخص پایداری غشای سلولی را نشان می‌دهد و هر دو شاخص می‌تواند فاکتور دیگری در تأیید تنش اکسیداتیو القاء شده توسط آلودگی نفتی باشد. در تحقیقی که توسط Liu و همکاران انجام گرفت افزایش محتوای MDA همزمان با افزایش فعالیت SOD در غلظت ۲۰۰-۱۰۰ میکروگرم بر گرم فناترن گزارش گردید (۲۵). Zhang و همکاران گزارش دادند به موازات افزایش آلودگی هیدروکربنهای نفتی محتوای MDA در گیاه مانگروو افزایش یافت. همچنین آلودگی هیدروکربنهای نفتی مانند روغنهای روان کننده باعث بروز تنش اکسیداتیو در گیاه و پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء سلولی گردید (۴۶). Li و همکاران نیز گزارش دادند که

همواره در پاسخ به افزایش انواع فعال اکسیژن میزان فعالیت آنزیمهای آنتی‌اکسیدانی نیز افزایش یابد (۳۰).

بررسی تغییر الگوی بیان ژنها در پاسخ به تنش آلودگی نفتی با استفاده از RT-PCR: یکی از مهم‌ترین پاسخهای مولکولی گیاهان تحت تنش تغییر در میزان نسخه‌های mRNA ژنهای مختلف پاسخ‌گر به تنش می‌باشد. ژن *COR15* رمز کننده پروتئینی است که در ارتباط با تنش در حفاظت از غشاء تیلاکوئیدی مطرح است. افزایش بیان این ژن در جو زراعی می‌تواند در ارتباط با حفاظت از کلروپلاست و سیستم فتوسنتزی گیاه تحت تنش نفتی باشد. به علاوه تعداد نسخه‌های این ژن به موازات افزایش آنتوسیانین افزایش یافت. به گزارش Chalker-Scott بیان ژنهای *COR* با افزایش بیوستنز آنتوسیانین در تنش سرما رابطه مستقیم دارد (۹).

برای بررسی نقش ABA به عنوان یک هورمون تنشی میزان نسخه‌های دو ژن کلیدی در بیوستنز و ترانسسانی علامت ABA یعنی *NCED* و *ABA1* در گیاهان تحت تنش سنجیده شد. *NCED* که آنزیم کلیدی را در مسیر بیوستنز ABA رمز می‌نماید در تبدیل ۹-سیس‌آپوکسی- کاروتنوئیدی اکسیژناز به گزانتونین نقش دارد. بر اساس مطالعات صورت گرفته این ژن یکی از ژنهای پاسخ‌گر به تنشهای غیر زیستی مانند خشکی بوده و میزان بیان آن در گیاه آراییدوپسیس تحت تنش خشکی به شدت افزایش می‌یابد (۱۳). در این پژوهش نیز میزان نسخه برداری این ژن در پاسخ به آلودگی نفتی افزایش یافت.

ABI یک سرین/ترئونین پروتئین فسفاتاز است که در مسیر ترانسسانی علامت ABA به عنوان یک تنظیم کننده منفی نقش دارد. در این تحقیق بیان ژن *ABII* جو دوسر در پاسخ به تنش نفتی افزایش یافت. با توجه به نقش این ژن در مسیر ترانسسانی علامت ABA می‌توان گفت که آلودگی نفتی موجب فعال شدن این مسیر و عملکرد ABA به عنوان یک هورمون تنشی در این شرایط عمل می‌کند، و

نیز تنشهایی مانند شوری، خشکی و دمای پایین موجب افزایش ABA در بافتهای رویشی می‌گردند. این هورمون با فعال سازی بسیاری از ژنهای پاسخ‌گر به تنش که آنزیمهای لازم برای بیوستنز اسمولیت‌های مختلف و پروتئینهای شبه LEA را کد می‌کند، اثر تنش بر گیاه را کاهش می‌دهد و همچنین از تأثیر بازدارندگی رشد اتیلن القایی طی تنش جلوگیری می‌کند (۱۷، ۴۵ و ۴۸). افزایش میزان ABA در شرایط تنش به طور عمده ناشی از افزایش بیوستنز ABA و تا حدی کاهش تجزیه این هورمون است. تنشهای شوری و خشکی نسخه برداری ژنهای کدکننده آنزیمهای درگیر در بیوستنز ABA را از مسیر فسفریلاسیون وابسته به کلسیم القاء می‌کند (۴۵ و ۴۸). همان گونه که قبلاً اشاره شد علاوه بر سمیت ترکیبات نفتی تنشهای دیگری نیز ممکن است به علت ماهیت خاص این ترکیبات بروز نماید. کاهش نفوذپذیری خاک، کمبود اکسیژن، خشکی و اختلال در انتقال آب و املاح و آسیبهای ناشی از سمیت و عدم سنخیت نفت با شیره آوندی، گیاه را در معرض انواع مختلف تنش قرار می‌دهد. لذا افزایش نسخه برداری ژن *NCED* ممکن است به عدم کارایی آب و اختلال در انتقال املاح ناشی از آلودگی نفتی نسبت داده شود. بر اساس نتایج حاصل از سنجش مقدار کاروتنوئیدها میزان این پیگمانها در گیاهان تحت تنش آلودگی نفتی کاهش یافت. از آنجایی که کاروتنوئیدها پیش ساز سنتز هورمون ABA هستند این کاهش می‌تواند ناشی از بیوستنز این هورمون باشد (۲۹). در مجموع بررسی میزان نسخه‌های ژن *NCED* و مقدار کاروتنوئیدهای گیاه ممکن است شاخصهای مناسب برای ارزیابی میزان تحمل تنش نفتی توسط گیاه باشند. افزایش میزان MDA در گیاه تحت تنش نفتی نشان دهنده بروز اختلال در ماهیت لیپیدی غشاء سلولی است که می‌تواند بر جذب املاح تأثیر گذار باشد. با این حال میزان این متابولیت در ریشه اندازه گیری نشد لذا جهت مطالعه دقیق‌تر تأثیر تنش نفتی بر گیاه سنجش مقدار MDA در ریشه و غلظت املاح در بخشهای مختلف

توجه به تغییر شاخصهای فیزیولوژیک مانند تغییر میزان کلروفیل، کاروتنوئید، H_2O_2 ، MDA و آنتی‌اکسیدانهای آنزیمی در هر دو گیاه تک‌لپه‌ای مورد مطالعه، شاید بتوان این شاخصها را به عنوان نشانه هشدار دهنده برای بررسی اثر منفی آلاینده‌های نفتی حداقل در گیاهان تک‌لپه‌ای خانواده پوآسه توصیه نمود.

افزایش شاخصهای رشد جو دوسر شامل وزن ریشه، شاخه و ارتفاع و شاخصهای فیزیولوژیک نظیر کلروفیل b و کاروتنوئید در گیاهان تلقیح شده تحت تنش نشان داد تلقیح باکتریایی در خاک آلوده باعث بهبود رشد این گیاه گردید و این امر می‌تواند به کاهش سمیت آلاینده‌های نفتی و تنش ناشی از این ترکیبات و به دنبال آن به مقابله بهتر گیاه به تنش نفتی نسبت داده شود.

منابع

۱. سید شریفی، ر. و خواوازی، ک.، ۱۳۹۱، تأثیر پرایمینگ بذر با باکتریهای محرک رشد بر فیلولوکرون و سرعت ظهور برگ ذرت (*Zea mize L.*) مجله زیست‌شناسی ایران، ۲۵(۲): ۱۸۳-۱۹۳.
۲. میرزایی، م.، معینی، ا. و قناتی، ف.، ۱۳۹۲، اثر تنش خشکی بر میزان پرولین و قندهای محلول گیاهیچه های کلزا (*Brassica napus*) مجله زیست‌شناسی ایران، ۲۶(۱): ۹۰-۹۸.
۳. نورانی آزاد، ح. و کفیل زاده، ف.، ۱۳۹۰، تأثیر سمیت کادمیوم بر رشد، قندهای محلول، رنگیزه های فتوسنتزی و برخی آنزیمها در (*Carthamus tinctorius L.*) گلرنگ، مجله زیست‌شناسی ایران، ۲۴(۶): ۸۵۸-۸۶۷.
4. Abeles, F.B., & Biles, C.L. (1991) Characterization of peroxidase in lignifying peach fruit endocarp, *Plant Physiology* 95, 269-273.
5. Aebi, H. (1984) Catalase in vitro, *Methods in Enzymology* 105, 121-126.
6. Alarcon, FA., Davies, F.T., Autenrieth, R.L., & Zuberer, D.A. (2008) Arbuscular mycorrhiza & petroleum-degrading microorganisms enhance phytoremediation of petroleum-contaminated soil, *International Journal of Phytoremediation* 10:251-263.
7. Alkio, M., Tabuchi, T.M. & Carmona, A.C. (2005) Stress responses to PAHs in Arabidopsis include growth inhibition & hypersensitive response, *Journal of Experimental Botany* 56, 2983-2994.
8. Bartels, D., & Sunkar, R. (2005) Drought & salt tolerance in plants, *Critical Reviews in Plant Sciences* 24, 23-58.
9. Chalker-Scott, L. (1999) Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses, *Photochemistry & Photobiology* 70, 1-9.
10. Chalker-Scott, L. (2001) Do anthocyanins function as osmoregulators in leaf tissues, *Annual Meeting of the Botanical Society of America, Symposium*. Albuquerque, NM.
11. Chupakhina, G.N., & Maslennikov P.V. (2004) Plant adaptation to oil stress, *Russian Journal of Ecology* 35, 290-295. Translated from *Ekologiya*.
12. Du, Z., & Bramlage, W.J. (1992) Modified thiobarbituric acid assay for measuring lipid oxidation in sugar-rich plant tissue extracts,

- Journal of Agriculture & Food Chemistry 40, 1566-1570.
13. Endo, A., Sawada, Y., Takahashi, H. & Nambara, E. (2008) Drought induction of Arabidopsis 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase occurs in vascular parenchyma cells, *Plant Physiology* 147, 1984-1993.
 14. Erylmaz, F. (2006) The relationship between salt stress & anthocyanin content in higher plants, *Journal of Biotechnology* 12, 47-52.
 15. Escalante, E.E., Gallegos, M.M.E., Favela, T.E., & Gutierrez, R.M. (2005) Improvement of the hydrocarbon phytoremediation rate by *Cyperus laxus* Lam. inoculated with a microbial consortium in a model system, *Chemosphere* 59, 405-413.
 16. Fernet, J.L. (2008) Plant bacterial inoculants to remediate hydrocarbon polluted soil. Masters of Science Thesis, Department of Soil Science University of Saskatchewan.
 17. Finkelstein, R.R., Gampala, S.S., & Rock, C.D. (2002) Abscisic acid signaling in seeds & seedlings, *Plant Cell* 14, 15-45.
 18. Grace, S.C., & Logan, B.A. (2000) Energy dissipation & radical scavenging by the plant phenyl propanoid pathway, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological* 355, 1499-1510.
 19. Huang, X.D., El-Alawi, Y., Penrose, D.M., Glick, B.R., Greenberg, & B.M. (2004). Responses of three grass species to creosote during phytoremediation, *Environmental Pollution* 130, 453-463.
 20. Ilangovan, K., & Vivekanandan, M. (1992) Effect of oil pollution on soil respiration & growth of *Vigna mungo* (L.) Hepper, *The Science of the Total Environment* 116, 187-194.
 21. Kitahata, N., Kobayashi, M. & Asami, T. (2006) A 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase inhibitor for use in the elucidation of ABA action mechanisms, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14, 5555-5561.
 22. Li, C.R., Wang, W.K., & Cao, Y.Q., (2007) Effects of petroleum polluted soil on the soybean growth, *Journal of Safety & Environment* 7, 28-35.
 23. Lichtenthaler, H.K., & Wellburn, A.R. (1983) Determinations of total carotenoids & chlorophylls a & b of leaf extracts in different solvents, *Biochemical Society Transactions* 603, 591-592.
 24. Liste, H.H., & Felgentreu, D. (2006) Crop growth culturable bacteria & degradation of petrol hydrocarbons (PHCs) in a long-term contaminated field soil, *Applied Soil Ecology* 31, 43-52.
 25. Liu, W., Li, P., Zhou, Q., Sun, T., Tai, P. & Zhang, H. (2003) Effect of short-term phenanthrene stress on SOD activities & MDA contents in soybean seedlings. *Chinese Journal of Applied Ecology* 14, 581-4.
 26. Lobato, A.K.S., Costa, R.C.L., Neto, M.A.M., Neto, O., Santos, C.F., Filho, B.G., Alves, G.A.R., Freitas, J.M.N. & Coimbra, G.K. (2009) Responses of the photosynthetic pigments & carbon metabolism in *Vigna unguiculata* Cultivars submitted to water deficit, *Research Journal of Biological Science* 4, 593-59.
 27. Loreto, F., & Velikova, V. (2001) Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage quenches ozone products & reduces lipid peroxidation of cellular membranes, *Plant Physiology* 127, 1781-1787.
 28. Magne, C., & Larher, F. (1992) High sugar content of extracts interferes with colorimetric determination of amino acids & free proline, *Analytical Biochemistry* 200, 115-118.
 29. Mahajan, S., & Tuteja, N. (2005) Cold salinity & drought stresses: An overview, *Archives of Biochemistry & Biophysics* 444, 139-158.
 30. Martíá, M.C., Camejoa, D., Fernández, N., Rellán, A.R., Marquesc, S., Sevilla, F., & Jiménez, A. (2009) Effect of oil refinery sludges on the growth & antioxidant system of alfalfa plants, *Journal of Hazardous Materials* 171, 879-885.
 31. Merkl, N., Schultze-kraft, R., & Infante, C. (2004) Phytoremediation in the tropics-the effect of crude oil on the growth of tropical plants, *Bioremediation Journal* 8, 177-184.
 32. Merkl, N., Schultze-Kraft, R., & Infante, C. (2005b) Phytoremediation in the tropics - influence of heavy crude oil on root morphological characteristics of graminoids, *Environmental Pollution* 138, 86-91.
 33. Merkl, N., Schultze-kraft, R., & Infante, C., (2005a) Assessment of tropical grasses & legumes for phytoremediation of petroleum-contaminated soils, *Water, Air, & Soil Pollution* 165, 195-209.
 34. Merzlyak, M.N., & Chivkunova, O.B. (2000) Light-stress-induced pigment changes &

- evidence for anthocyanin photoprotection in apples, *Journal of Photochemistry & Photobiology* 55, 155-163.
35. Mishra, A., & Nautiyal, C. (2009) Functional diversity of the microbial community in the rhizosphere of chickpea grown in diesel fuel-spiked soil amended with *Trichoderma reesei* using sole-carbon-source utilization profiles, *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 25, 1175–1180.
 36. Nie, M., Yang, Q., Jiang, L., Fang, C., Chen, J., & Li, B. (2010) Do plants modulate biomass allocation in response to petroleum pollution? *Biology Letters* 6, 811-814.
 37. Pena-Castro, J.M., Barrera-Figueroa, B.E., Fernandez, L.L., Ruiz, M.R., & Xoconostle, C.B. (2006) Isolation & identification of up-regulated genes in bermudagrass roots (*Cynodon dactylon* L.) grown under petroleum hydrocarbon stress, *Plant Science* 170, 724-731.
 38. Qiu, Z.B., Liu, X., Tian, X.J., & Yue, M. (2008) Effect of CO₂ laser pretreatment on drought stress resistance in wheat, *Journal Photochemistry & photobiology B: Biology* 90, 17-25.
 39. Rajaei, S.M., Niknam, V., Seyedi, S.M., Ebrahimzadeh, H., & Razavi, K. (2009) Contractile roots are the most sensitive organ in *Crocus sativus* to salt stress, *Biologia Plantarum* 53, 401-600.
 40. Robertson, S.J., McGill, W.B., Massicotte, H.B., & Rutherford, P.M. (2007) Petroleum hydrocarbon contamination in boreal forest soils: a mycorrhizal ecosystems perspective, *Biology Review* 82, 213–240.
 41. Seyedi, S.M., Timko, M.P., & Sundqvist, C. (2001) The distribution of Protochlorophyllid & chlorophyll within seedling of the lip1 mutant of pea, *Plant & Cell Physiology* 42, 931-941.
 42. Shao, H.B., Guo, Q.J., Chu, L.Y., Zhao, X.N., Zh, S., Hu, L., & Cheng, J.F. (2007) Understanding molecular mechanism of higher plant plasticity under abiotic stress, *Colloids & Surfaces* 54, 37-45.
 43. Tesar, M., Reichenauer, T.G., & Sessitsch, A. (2002) Bacterial rhizosphere populations of black poplar & herbal plants to be used for phytoremediation of diesel fuel, *Soil Biology & Biochemistry* 34, 1883–1892.
 44. Tsao, D.T. (2003) Overview of phytotechnologies. *Advances in biochemical engineering biotechnology*, Vol. 78: *Phytoremediation*. T. Scheper, & D.T., Tsao (Eds). Springer, New York, pp. 1-50.
 45. Tuteja, N. (2007) Abscisic acid & abiotic stress signaling, *Plant Signaling & Behavior* 2, 135-138.
 46. Vavrek, M.C., Colgan, W., & Campbell, W.J. (2001) The role of plant-bacterial-fungal interaction in remediation of oak-hickory-pine-systems. Louisiana Applied & Educational Oil Spill, Technical Report, S 01-015.
 47. Wang, W., Vinocur, B., & Altman, A. (2003) Plant responses to drought salinity & extreme temperatures, *Planta* 218, 1-14.
 48. Xiong, L., & Zhu, J.K. (2003) Regulation of abscisic acid biosynthesis, *Plant Physiology* 133, 29–36.
 49. Zhang, C.G., Leung, K.K., Wong, Y.S., & Tam, N.F.Y. (2007) Germination growth & physiological responses of mangrove to lubricating oil pollution, *Environmental & Experimental Botany* 60, 127–136.

Effects of soil petroleum contamination on some physiological and molecular properties of plant

Rajaei S.¹, Seyedi S.M.², Raiesi F.³, Shiran B.³ and Moazam Jazi M.²

¹ Industrial and Environmental Biotechnology Dept., National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, (NIGEB), Tehran, I.R. of Iran

² Plant Biotechnology Dept., National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, (NIGEB), I.R. of Iran

³ Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, I.R. of Iran

Abstract

Phytoremediation efficiency -a cost effective and environmentally sound technology to clean up contaminated soil - is reduced considering abiotic stresses. The research objective was to determine the effects of aged petroleum contaminated soil (10% W/W: Total petroleum Hydrocarbons) on two grasses species (wild oat and barley) during the phytoremediation process. In addition the effects of petroleum degrading rhizobacteria inoculation were evaluated on plant growth promotion and decreasing toxicity of petroleum hydrocarbons. Results demonstrated that petroleum contaminated soil reduced growth, photosynthetic pigments and increased hydrogen peroxide (H₂O₂), MDA (malondialdehyde), enzymatic antioxidants (catalase and peroxidase) and *NCDE* and *COR2* gene transcripts that indicate oxidative stress happened because of petroleum pollution similar to other common abiotic stress. a/b chlorophyll ratio enhancement and more decrease in shoot dry weight in wild oat showed barley was more tolerate to petroleum pollution. Bacterial inoculation reduced petroleum contamination toxicity and improved plant growth especially in wild oat.

Key words: Phytoremediation, Petroleum Contamination Stress, Barley and Wild Oat.