مقاله پژوهشی

تأثیر آلاینده نفتی فنانترن بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه وتیور (*Chrysopogon zizanioides*)

نادره نادری[۱]، ساسان محسن‌زاده*[۱]، علی مرادشاهی[۱]، هاجر زمانی[۱] و مهدی زارعی[۲]

[۱] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شیراز، [۲] گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۰۶، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۰/۱۰/۲۹)

چکیده

وتیور گیاهی از تیره گندمیان است که به‌دلیل مقاومت بالا، سازگاری با محیط‌زیست و قابلیت بالای جذب آلودگی‌ها، می‌تواند در فرآیندهای حذف آلاینده‌های محیطی مورد استفاده قرار گیرد. از بین ترکیبات نفتی، هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای به‌دلیل پایداربودن در محیط به‌عنوان آلوده‌کنندگان اولیه شناخته شده‌اند. فنانترن معمولاً بیش‌ترین غلظت و آلاینده‌ترین در بین ترکیبات آروماتیک نفتی است. در این پژوهش، گیاه وتیور در گلدان با غلظت‌های فنانترن صفر (کنترل منفی)، صفر با استون (کنترل مثبت)، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن خشک خاک کاشته شد و اثرات فیزیولوژیک آن مورد بررسی قرار گرفت. در بالاترین غلظت فنانترن میزان کلروفیل و کاروتنوئید به ترتیب ۲۰ درصد و ۲۱ درصد کاهش ولی ترکیبات فنولی، پرولین و فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش یافت. وزن ریشه و بخش هوایی در غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم فنانترن، کاهش معنی‌داری نسبت به شاهد داشت اما در غلظت‌های بعدی، شیب کاهشی آن کمتر شد. طول ریشه و حجم ریشه نیز روند کاهشی را نشان داد. چون فنانترن در ریشه انباشته شده است، لذا کاهش رشد بیشتری را نسبت به اندام هوایی نشان می‌دهد. حداکثر تجمع فنانترن در ریشه گیاه وتیور، ۵۱۹ میلی‌گرم بر کیلوگرم در حداکثر غلظت فنانترن (۴۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن خشک خاک) مشاهده شد. با توجه به مقاومت وتیور به غلظت‌های بالای فنانترن و تجمع در ریشه آن، می‌تواند به‌عنوان گزینه بسیار مناسبی برای فرآیند گیاه پالایی ترکیبات نفتی بکار برده شود.

واژه‌های کلیدی: آلودگی نفتی، اثرات فیزیولوژیک، گیاه‌پالایی، هیدروکربن‌های آروماتیک، گندمیان

مقدمه

گیاه وتیور *Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty از تیره گندمیان (Poaceae) است (Cheng *et al.*, 2003). این گیاه به‌دلیل داشتن پتانسیل گیاه‌پالایی مورد توجه قرارگرفته است (Truong *et al.*, 2009). راندمان گیاه وتیور در جذب مواد غذایی محلول مانند نیتروژن، پتاسیم، فسفر و یا فلزات سنگین در آب‌های آلوده، بسیار بالا است. وتیور مقاومت زیادی به آلومینیوم، منگنز و فلزات سنگینی از جمله آرسنیک، کادمیوم، کروم، نیکل، سرب، جیوه، سلنیم و روی موجود در خاک دارد (Truong and Baker, 1998; Truong *et al.*, 2009). براساس ویژگی‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی وتیور، از آن به صورت موفقیت‌آمیزی جهت احیای معادن تخریب‌شده سرب، روی، بوکسیت (Shu, 2003)، طلا، بتونیت، مس، الماس و پلاتین استفاده شده است (Truong *et al.*, 2009). با وجود

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: mohsenz@shirazu.ac.ir

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1401.11.48.7.8]

اینکه غلظت عناصر در وتیور به اندازه بیشتر انباشتگرها نیست، اما رشد سریع و تولید ماده فراوان (تولید ماده خشک سالیانه تا ۱۰۰ تن در هکتار) به وتیور این فرصت را داده است که حجم زیادتری از مواد غذایی و فلزات سنگین را از زمین‌های آلوده نسبت به بیش انباشتگرها برداشت کند. وتیور به‌صورت رضایت‌بخشی بر روی پسماندهای سدیمی با درصد سدیم قابل تبادل ۴۸٪ و معدن زغال با سطح سدیمی ۳۳٪ رشد می‌کند (Truong, 2004). استفاده از گیاهان به‌منظور حذف آلودگی‌ها از خاک‌های آلوده، انباشته‌کردن آن‌ها در ریشه و برداشت آن‌ها از ساقه و برگ را گیاه‌پالایی می‌گویند (Lasat, 2002; Tang *et al.*, 2003). گیاه‌پالایی فناوری نوپایی است که به‌دلیل مزیت‌های مقرون به‌صرفه بودن، زیبایی و کاربرد طولانی مدت آن، باید برای پاکسازی مکان‌های آلوده در نظر گرفته شود (Boonyapookana *et al.*, 2005; Su and Wong, 2004). گیاه‌پالایی معایبی نیز دارد که از آن جمله می‌توان به زمان بر بودن، تحت‌تأثیر اقلیم بودن، محدودبودن به منطقه ریشه و تأثیر احتمالی بر زنجیره غذایی اشاره کرد (احمدی و بیدلی، ۱۳۸۴). وتیور تحمل سازگاری با اقلیم‌هایی با شرایط متفاوت را دارا بوده و همچنین قادر است دامنه دمایی ۱۴- تا ۵۵ درجه سانتی‌گراد را تحمل کند (Truong and Baker, 1996). همچنین، دمای بهینه برای رشد وتیور ۲۵ درجه سانتی‌گراد است (Truong *et al.*, 2009). مقاومت وتیور به اسیدیته خاک نیز بسیار بالا است (Du and Truong, 2003). راندمان وتیور در جذب مواد محلول مانند ترکیبات نیتروژن‌دار، پتاسیم، فسفات و همچنین فلزات سنگین موجود در آب‌های آلوده بالا گزارش شده است (Truong and Baker, 1998; Truong *et al.*, 2009). وتیور به‌طور گسترده‌ای در آفریقا، هند، میانمار، سریلانکا و جنوب شرقی آسیا توزیع شده است (Moore *et al.*, 2006). این گیاه بومی ایران نیست اما به‌دلیل اینکه بذر تولید نمی‌کند و درنتیجه عقیم بوده و مهاجم نیست، می‌تواند به عنوان یک گیاه‌پالای مناسب در ایران مورد استفاده قرار گیرد.

نفت به‌عنوان یک منبع انرژی بسیار مهم و همچنین به‌عنوان ماده‌خام در پالایشگاه‌های نفت و صنایع شیمیایی وابسته، بشمار می‌آید (Atlas, 1981; Varjani *et al.*, 2015). گیاه وتیور، یک علف تند رشد با یک سیستم ریشه‌ای وسیع و پیچیده است که توانایی جذب ۲،۴،۶- تری نیتروتولوئن را دارد (Makris *et al.*, 2007). این گیاه توانایی گیاه‌پالایی فنول و هیدروکربن‌های نفتی را نیز دارد (Brandt *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2008). در مطالعه‌ای که به بررسی تأثیر ماندگاری گیاه وتیور تحت شرایط استفاده از غلظت‌های مختلف شیرابه پسماند شهری شهر شیراز انجام شد، گزارش شد که این گیاه می‌تواند تا غلظت شیرابه ۴۵ درصد را تحمل کرده و زنده بماند (محسن-زاده و همکاران، ۱۳۹۵). در مناطق نفتی اهواز غلظت‌های ۱، ۵ و ۱۰ درصد نفت خام را به خاک اضافه کردند و میزان حذف TPH (Total Petroleum Hydrocarbons) از خاک آلوده، در حضور و عدم‌حضور گیاه وتیور اندازه‌گیری شد و مشخص گردید که گیاه وتیور در غلظت‌های اضافه-شده نفت خام زنده مانده و پالایش خاک را انجام می‌دهد (Takdastan *et al.*, 2017). گیاه وتیور با تجمع کبالت و افزایش آن به‌طور معنی-داری در گیاه‌پالایی کمک می‌کند (نادری و همکاران، ۱۳۹۲). همچنین گیاه وتیور قادر است فلز سنگین نیکل را از خاک حذف کرده و با انباشت آن در ریشه، به پاکسازی محیط‌زیست کمک نماید (نظری و همکاران، ۱۳۹۶).

در کار تحقیقاتی دیگری به مطالعه نقش گیاه سورگوم (*Sorghum vulgare*) در حذف آلاینده فوق با روش گیاه پالایی پرداخته شده است. به‌منظور بررسی تأثیر آلاینده بر فعالیت‌های فیزیولوژیک گیاه، ابتدا میزان کلروفیل و بیوماس تولیدی و سپس برای تعیین ریسک اکولوژیکی روش، میزان تجمع آلاینده مذکور در گیاه و خاک مطالعه شد. نتایج بدست آمده نشان داد که گیاه مذکور میزان حذف آلاینده در خاک را در شرایط اعمال‌شده تا ۲۰ درصد افزایش داده است و ثابت گردید که آلاینده در ناحیه ریزوسفر گیاه تجزیه شده است (علایی و همکاران، ۱۳۸۹).

طبق گزارش EPA (Environmental Protection Agency)، صنایع پالایشگاه نفت یکی از ده منبع اصلی آزادکننده مواد سمی به محیط است. در چند سال گذشته،

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1401.11.48.7.8]

آلودگی هیدروکربن‌های نفتی، به‌دلیل سمیت آن برای ریز جانداران و دیگر موجودات از جمله انسان، به جدی‌ترین نگرانی‌های جهانی تبدیل شده است (Saeki *et al.*, 2009; Hasanuzzaman *et al.*, 2007; Varjani and Upasani, 2016).

نفت خام مخلوطی از تعداد زیادی ترکیبات آلی (عمدتاً هیدروکربن‌ها) همراه با نیتروژن و سولفور و همچنین ترکیبات غیر آلی مانند فلزات است (Chandra *et al.*, 2013). هیدروکربن‌ها می‌توانند ترکیباتی بدون انشعاب یا انشعاب‌دار، آلیفاتیک‌های اشباع یا غیراشباع، آلیسیکلیک، آروماتیک و پلی‌آروماتیکی باشند (Zhang *et al.*, 2011; Waigi *et al.*, 2015; Lamichhane *et al.*, 2016; Wilkes *et al.*, 2016). هیدروکربن‌های نفتی به چهار شاخه اصلی تقسیم‌بندی می‌شوند: آلکان‌ها، ترکیبات آروماتیک از قبیل بنزن، تولوئن، اتیل بنزن، زایلن‌ها و هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای (Polycyclic Aromatic Hydrocarbon) (PAHs)، رزین‌ها شامل ترکیباتی که دارای نیتروژن، سولفور و اکسیژن بوده و در نفت حل می‌شوند و آسفالت‌ها که مولکول‌های پیچیده و درشتی به‌صورت کلوئیدی در نفت خام هستند (Gentili *et al.*, 2006; Abdel-Shafy and Mansour, 2016; Varjani, 2017). از بین آلودگی‌های هیدروکربن‌های نفتی، ۱۶ هیدروکربن آروماتیک چندحلقه‌ای، به‌دلیل پایداربودن در محیط، به‌عنوان آلوده‌کنندگان اولیه شناخته شده‌اند (Zhang *et al.*, 2011; Abdel-Shafy and Mansour, 2016; Lamichhane *et al.*, 2016; Varjani, 2017). این آلاینده‌ها به‌دلیل داشتن سمیت، تبخیر کم، مقاومت به تجزیه میکروبی و تمایل بالا به تشکیل رسوب، در بین سایر هیدروکربن‌های نفتی نگرانی بیشتری را سبب گردیده‌اند (Atlas, 1981; Louvado *et al.*, 2015; Abdel-Shafy and Mansour, 2016; Varjani and Upasani, 2016). اکنون، نگرانی‌ها درباره سلامتی انسان و خطرات محیطی فعالیت‌های صنعتی مرتبط با اکتشاف نفت خام و همچنین تخلیه عمدی یا تصادفی نفت در طول مراحل انتقال، تولید و پالایش آن رو به افزایش است (Baderna *et al.*, 2011; Ghosh *et al.*, 2015; Varjani *et al.*, 2015).

فنانترن از هیدروکربن‌های آروماتیک است که معمولاً بیش‌ترین غلظت را در بین هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای در خاک‌های آلوده دارا است (Subramaniam *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2008). طی مطالعاتی که در زمینه تجزیه هیدروکربن‌های آروماتیک انجام شده، مشخص گردیده است که تجزیه زیستی فنانترن توسط ریز جانداران به کمک یک سری از آنزیم‌ها انجام می‌شود که درنهایت باعث تبدیل‌شدن فنانترن به مواد غیرسمی می‌گردد فنانترن با توجه به خواص شیمیایی و سرطان‌زایی که دارد معمولاً در تحقیقات زیست پالایی به‌عنوان سوبسترای میکروبی برای مطالعات متابولیسم ترکیبات PAHs مورد استفاده قرار می‌گیرد (Samanata *et al.*, 1999). فنانترن در لیست آلاینده‌ترین ترکیبات قرار گرفته است و باعث اثرات زیان‌آور زیستی می‌شود. افرادی که در معرض آلودگی این ماده قرار می‌گیرند، پوست آن‌ها به نور حساس شده و مقدار کمی آلرژی ایجاد می‌کند. در سیستم‌های باکتریایی تحت شرایط مشخص جهش‌زایی می‌شود (Coral and Karagoz, 2005; Pinyakong *et al.*, 2012). فنانترن، از احتراق ناقص سوبستراهای آلی مانند زغال‌سنگ، نفت، گاز، چوب، زباله و از صنایع پتروشیمی و پالایشگاه‌های نفت ایجاد می‌شود (Santos *et al.*, 2008). قدرت تحمل اکثر گیاهان تا غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک فنانترن گزارش شده است و غلظت‌های بالاتر از آن باعث کاهش شدید زنده‌مانی گیاهان می‌شود (Muratova *et al.*, 2009). با کاشت گیاهان در محیط حاوی فنانترن، مقداری فنانترن در ریشه برخی گیاهان ذخیره می‌شود و مقداری از آن به ترکیبات هیدروکربنی دیگر تبدیل می‌شود (Wei and Pan, 2010). با تبدیل‌شدن فنانترن به ترکیبات دیگر، خواص آن تغییر می‌کند اما در مورد میزان تغییر سمیت و اثر آن بر تغذیه علف‌خواران و به‌دنبال آن، تغذیه گوشت‌خواران اطلاعات دقیقی در دسترس نیست.

با توجه به اینکه آلودگی بر اثر آلاینده‌های نفتی در محیط‌زیست به‌دلیل توسعه و پیشرفت صنعت رو به افزایش است و اینکه گیاه وتیور توانایی رشد و مقاومت زیادی در برابر خاک‌های آلوده از خود نشان داده است، تحقیق حاضر با

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1401.11.48.7.8]

هدف بررسی تأثیر آلاینده نفتی فنانترن بر میزان رشد و همچنین ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه وتیور صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر در گلخانه تحقیقاتی دانشکده علوم دانشگاه شیراز، در سال ۱۳۹۶، به‌مدت نه ماه انجام شد. پژوهش به صورت طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی در هفت سطح و سه تکرار اجرا شد که در آن اثر غلظت‌های مختلف فنانترن خاک بر روی گیاه وتیور، به‌مدت شش ماه مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۱۰۰ عدد گلدان نهالی وتیور از مرکز پرورش وتیور اهواز تهیه گردید. برگ‌های خشک وتیور حذف شده و در گلدان‌های نهالی جدید کاشته شد. جهت همسان‌بودن گلدان‌ها، در هر گلدان چهار بوته وتیور قرار داده شد و به‌مدت سه ماه مورد مراقبت قرار گرفت. خاک مورد نظر از منطقه دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز تهیه، همگن‌سازی و الک شد و جهت تعیین بافت و ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی آن به آزمایشگاه تحویل داده شد (جدول ۱). فنانترن (شماره ثبت: ۸-۰۱-۸۵) با خلوص ۹۸ درصد محصول شرکت مرک آلمان به‌عنوان آلاینده مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۲). جهت ساخت تیمارهای مختلف فنانترن در خاک، فنانترن در استون حل و بر روی خاک اسپری شد. مقدار فنانترن مورد نیاز برای هر غلظت وزن شد و در ظروف جداگانه قرار داده شد، در هر ظرف به مقداری استون ریخته شد تا تمام فنانترن‌های موجود در ظرف حل شود، سپس از غلظت کمتر شروع کرده و در ظرف محلول‌پاش ریخته و بر خاک پهن شده بر روی نایلون اسپری شد و به همین ترتیب تا غلظت آخر اسپری انجام شد. در نهایت، هر کدام از غلظت‌های خاک آلوده‌شده به فنانترن، بطور کامل و چندین بار همگن‌سازی شد (Li *et al.*, 2020). به‌دلیل ایجاد آلودگی مصنوعی (اسپری‌کردن فنانترن)، ۲۴ ساعت زمان داده شد تا استونی که برای حل‌کردن فنانترن استفاده شده بود، تبخیر گردد. سپس گیاه وتیور در خاک آلوده کاشته شد. در مطالعات قبلی، حداکثر تا غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک فنانترن استفاده شده است (Li *et al.*, 2020; Wei and Pan, 2010; بسالت‌پور و همکاران، ۱۳۸۹). با توجه به مقاومت بالای وتیور و جنبه نوآوری کار، پژوهش اخیر شامل هفت سطح تیمار بود که عبارتند از: شاهد (خاک بدون آلاینده و بدون استون)، شاهد دوم (خاک بدون آلاینده و با حلال استون) و غلظت‌های ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ میلی‌گرم فنانترن در کیلوگرم وزن خشک خاک. جهت انجام پژوهش تعداد ۲۱ عدد از همسان‌ترین گلدان‌ها انتخاب شدند و پس از شستن ریشه‌ها، با توجه به رشد سریع ریشه وتیور و جهت محدود نشدن رشد آن، وتیور در گلدان های ۵ کیلویی در هفت سطح خاک مورد نظر کاشته شدند. اندازه‌گیری‌ها بر روی گیاهان حدود یک ساله انجام گرفت.

وزن خشک ریشه و بخش هوایی: مقدار یک گرم از بافت تر ریشه و یک گرم از بافت تر بخش هوایی جداسازی و بعد از خشک‌شدن در آون، وزن آن‌ها اندازه‌گیری شد و با توجه به آن وزن خشک کل ریشه و بخش هوایی محاسبه گردید. به‌دلیل اینکه برای برخی اندازه‌گیری‌های بعدی باید نمونه به صورت تر استفاده می‌شد لذا از روش وزن تر مستقیما برای اندازه‌گیری استفاده کردیم.

حجم و طول ریشه: ریشه‌های هر تیمار پس از جداسازی و شستن، درون بشر یک لیتری مدرج که ۵۰۰ میلی‌لیتر آن از آب پر شده بود، فرو برده شد و میزان افزایش حجم آب درون بشر به‌عنوان حجم ریشه و اندازه بلندترین ریشه به‌عنوان طول ریشه گیاه در نظر گرفته شد.

محتوی نسبی آب برگ (RWC): مقدار یک گرم برگ بلافاصله بعد از جداشدن از گیاه به قطعات یک سانتی‌متری بریده و در لوله‌های استوانه‌ای شیشه‌ای حاوی ۵۰ میلی‌لیتر آب‌مقطر سرد قرار گرفت و به‌مدت ۲۴ ساعت در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت پس از گرفتن آب ظاهری، وزن اشباع برگ‌ها اندازه‌گیری و سپس برگ‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در آون تهویه‌دار قرار داده شد پس از آن وزن خشک هر کدام اندازه‌گیری گردید (Barrs and Weatherle, 1962).

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1401.11.48.7.8]

جدول ۱- آنالیز خاک

هدایت الکتریکی (میلی‌زیمنس در سانتی‌متر)	۳/۲	درصد لای	۲۲/۱۰
پی اچ	۷/۹۸	درصد رس	۱۵/۷۰
درصد شن	۶۲/۲۰	بافت	شنی لومی

جدول ۲- مشخصات فنانترن

فرمول شیمیایی	تعداد حلقه بنزن	وزن مولکولی (گرم در مول)	نقطه ذوب (درجه سانتی‌گراد)	نقطه جوش (درجه سانتی‌گراد)	میزان حلالیت در آب ۱۵ درجه سانتی‌گراد (میلی‌گرم در لیتر)
$C_{۱۴}H_{۱۰}$	۳	۱۷۸/۲	۱۰۱	۳۴۰	۱/۶

کلروفیل و کارتنوئید: ابتدا ۰/۱ گرم برگ با ازت مایع در هاون پودر کرده و به درون فالکون ریخته شد و با استون ۸۰ درصد به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده و محلول حاصل را درون اسپکتروفتومتر قرار داده و با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه (RPM) به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. جذب محلول رویی با دستگاه اسپکتروفتومتر شیماتزو ژاپن در طول‌موج ۶۶۳ و ۶۴۵ برای کلروفیل (Arnon, 1967) و طول‌موج ۴۷۰ برای کارتنوئید (Litchtenthaler and Wellburn, 1983) خوانده شد.

فعالیت آنزیم کاتالاز: یک گرم برگ با ازت مایع در هاون پودر شد و با ۱۰ میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات ۲۰۰ میلی‌مولار کاملاً مخلوط گردید. سپس ۱۰ میکرولیتر تریتون ایکس-۱۰۰ به آن اضافه و مخلوط گردید. محلول حاصل را از پارچه ململ عبور داده و به‌عنوان عصاره خام برای تعیین فعالیت آنزیم کاتالاز استفاده شد. کلیه مراحل در درون ظرف یخ صورت گرفت. ۱۰۰ میکرولیتر عصاره خام، ۱ میکرولیتر هیدروژن پراکسید ۰/۰۳ مولار و ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات ۲۰۰ میلی‌مولار مخلوط گردید و توسط اسپکتروفتومتر در طول‌موج ۲۴۰ نانومتر در فواصل زمانی ۵ ثانیه به‌مدت ۱/۵ دقیقه جذب نور آن ثبت شد و میزان فعالیت آنزیم کاتالاز برحسب میکرومول H_2O_2 در دقیقه بر گرم وزن تر گزارش شد (Aebi, 1984).

ترکیبات فنولی: ۵۰۰ میلی‌گرم پودر خشک ساییده‌شده برگ را در یک لوله آزمایش ریخته، ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد به آن افزوده شد. لوله‌های آزمایش به‌مدت ۵ دقیقه در دستگاه امواج فراصوت (اولتراسونیک) با شدت ۴۰ کیلوهرتز قرار دادیم و سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰ سانتریفیوژ شد. محلول رویی برای سنجش مورد استفاده قرار گرفت. ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره را در لوله آزمایش ریخته و ۲/۵ میلی‌لیتر معرف فولین و ۲ میلی‌لیتر سدیم کربنات ۷/۵ درصد به آن افزوده شد. محتویات لوله آزمایش مخلوط و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری، سپس جذب عصاره در طول‌موج ۷۶۵ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر خوانده شد. برای محاسبه غلظت ترکیبات فنولی از منحنی استاندارد گالیک اسید استفاده گردید (Gao *et al.*, 2000).

پرولین: ابتدا ۰/۵ گرم برگ گیاه وتیور توسط ازت مایع در هاون پودر گردید و درون فالکون ریخته شد، سپس ۱۰ میلی‌لیتر از سولفوسالیسیلیک اسید ۳ درصد به آن اضافه گردید و در دستگاه سانتریفیوژ با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. ۲ میلی‌لیتر از محلول فوقانی سانتریفیوژ شده را به‌همراه ۲ میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین و ۲ میلی‌لیتر استیک اسید گلاسیال در لوله آزمایش ریخته و مخلوط می‌کنیم. محلول حاصل به‌مدت یک ساعت در حمام آب گرم با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از یک ساعت لوله‌های آزمایش را مستقیم به ظرف حاوی یخ منتقل کرده تا واکنش خاتمه یابد، سپس ۴ میلی‌لیتر تولوئن به محتوای داخل لوله اضافه گردید و به‌مدت ۳۰ ثانیه با دستگاه ورتکس به هم زده شد. جذب نوری محلول فوقانی در طول‌موج ۵۲۰ نانومتر

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1401.11.48.7.8]

توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد و با استفاده از منحنی استاندارد میزان پرولین برحسب میکرومول بر گرم وزن تر محاسبه شد (Bates *et al*., 1973).

فنانترن موجود در گیاه: نمونه‌های گیاهی توسط ازت مایع در هاون پودر شدند. سپس مقدار مشخصی پودر نمونه گیاهی در حلال استون و دی‌کلرومتان با نسبت حجمی (۱:۱) ریخته و جهت استخراج فنانترن به‌مدت یک ساعت در دستگاه امواج فراصوت قرار داده شد. فاز رویی جدا و پس از سه بار تکرار مراحل استخراج، جهت آنالیز از دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) با مشخصات ستون ۴/۶×۲۵۰ میلی‌متر استفاده گردید.

داده‌های بدست آمده، با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS 16 تجزیه شدند و میانگین‌ها با آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال پنج درصد مورد مقایسه قرار گرفت. جهت رسم نمودارها از برنامه Excel استفاده گردید.

نتایج و بحث

شاخص‌های رشد: همان‌طور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود با افزایش غلظت فنانترن، وزن خشک اندام هوایی و ریشه روند کاهشی محسوسی را نشان داد. تنش هیدروکربن‌های آروماتیک نفتی می‌تواند با ایجاد تنش در گیاه، باعث کاهش دفاع آنتی‌اکسیدانی شود که در پژوهش‌هایی به اثر تنش هیدروکربن‌های آروماتیک نفتی اشاره شده است (Liu *et al*., 2009; Jiang and Zhang, 2002; Alkio *et al*., 2005). کاهش دفاع آنتی‌اکسیدانی باعث آسیب سلول‌ها و بافت‌ها می‌شود. مولکول فنانترن همچنین ممکن است با میانکنش با گیرنده‌های آبسیزیک اسید، باعث ایجاد تنش کم آبی در گیاه شود (Vanova *et al*., 2009). به خوبی مشخص شده است که در خاک‌های آلوده نفتی به‌دلیل خاصیت سمی هیدروکربن‌ها، میزان جذب آب و مواد غذایی کاهش می‌یابد و درنهایت، باعث کاهش رشد گیاه می‌گردد (Kirk *et al*., 2005). تأثیر مشابهی نیز برای آلودگی‌های محیطی دیگر مانند فلزات سنگین بر روی گیاه ذرت دیده شده است (Polti *et al*., 2011). نفت خام و فرآورده‌های آن می‌توانند باعث کاهش رشد بخش هوایی و ریشه گیاه شوند که می‌تواند به تأخیر در رشد سلولی نیز مربوط باشد (Athar *et al*., 2016). با توجه به جدول ۳ نسبت وزن خشک اندام هوایی به ریشه روند افزایشی را نشان می‌دهد. با توجه به اینکه ریشه مستقیماً در معرض آلاینده قرار دارد کاهش رشد بیشتری نسبت به اندام هوایی داشته است. همچنین این احتمال وجود دارد که گیاه برای حفظ توده زیستی و فتوسنتز خود، بخش بیشتری از توده زیستی را به اندام هوایی اختصاص دهد. مطالعه‌ای که بر روی گیاه جو انجام شده نشان داد که توزیع زیست‌توده و همچنین فعالیت فیزیولوژیکی گیاهان رشد یافته در خاک‌های آلوده، نه تنها به سطح آلودگی، بلکه به نوع آلودگی نیز وابسته است (Pereira *et al*., 2010). حجم ریشه وتیور از اولین غلظت فنانترن (۲۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک)، تا ۶۲٪ کاهش یافت و پس از آن در غلظت‌های بالاتر، روند کاهشی شیب کمتری پیدا کرد. وزن خشک بخش هوایی و ریشه در غلظت ۴۰۰۰ میلی‌گرم فنانترن در کیلوگرم خاک نسبت به شاهد به‌ترتیب ۶۴/۶ و ۸۹/۴ درصد کاهش داشت. این یافته‌ها نشان می‌دهد که تکوین بخش‌های مختلف ریشه و افزایش قطر آن، نسبت به سایر شاخص‌های رشد، بیشتر تحت‌تأثیر سمیت فنانترن قرار می‌گیرد. میزان RWC در سطوح مختلف فنانترن اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. در مطالعه‌ای که روی ذرت انجام شد، مشخص گردید که میزان وزن خشک کل گیاه از ۰/۸۸ گرم در شاهد به ۰/۰۶ گرم در غلظت ۷۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک فنانترن کاهش یافت که نشان‌دهنده کاهش ۹۳ درصدی است. در همین مطالعه، میزان نسبی آب برگ با افزایش غلظت فنانترن، تغییر منظمی را نشان نداد اما میزان CO_2 ورودی به برگ نیز کاهش ۹۵ درصدی را نشان داد (Dupuy *et al*., 2015). طول ریشه از پایین‌ترین تا بالاترین غلظت فنانترن، کاهش تدریجی را نشان می‌دهد اما این کاهش در کمترین غلظت (۲۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک) و بیش‌ترین غلظت (۴۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک) محسوس‌تر است. در غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک به‌نظر می‌رسد که شوک یکباره به‌دلیل وجود

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1401.11.48.7.8]

جدول ۳- اثر فنانترن بر محتوی نسبی آب برگ و صفات رشدی اندام هوایی و ریشه گیاه وتیور

غلظت فنانترن در خاک (میلی‌گرم در کیلوگرم)	محتوی نسبی آب برگ (درصد)	وزن خشک اندام هوایی (گرم)	وزن خشک ریشه (گرم)	وزن خشک اندام هوایی به ریشه	حجم ریشه (میلی‌لیتر)	طول ریشه (سانتی‌متر)
صفر	۸۲/۲۳^{a}	۲۵/۶۸^{a}	۴۳/۸۲^{a}	۰/۶۱^{c}	۴۰۷^{a}	۹۲^{a}
صفر + استون	۷۹/۲۸^{a}	۲۴/۹۵^{a}	۴۰/۰۴^{a}	۰/۶۴^{c}	۴۱۰^{a}	۹۰^{a}
۲۵۰	۸۷/۳۵^{a}	۱۸/۶۵^{b}	۲۶/۷۴^{b}	۰/۶۹^{c}	۱۵۳^{b}	۷۳^{b}
۵۰۰	۸۳/۲۰^{a}	۱۷/۳۴^{bc}	۱۸/۲۰^{c}	۰/۹۵^{bc}	۱۴۲^{bc}	۶۷^{b}
۱۰۰۰	۸۵/۷۵^{a}	۱۱/۷۱^{bcd}	۹/۴۰^{d}	۱/۳۵^{b}	۱۲۲^{cd}	۶۵^{b}
۲۰۰۰	۸۴/۶۹^{a}	۱۲/۵۰^{cd}	۸/۶۷^{d}	۱/۴۰^{b}	۱۱۰^{de}	۶۲^{b}
۴۰۰۰	۸۱/۴۹^{a}	۹/۱۰^{d}	۴/۶۳^{d}	۱/۹۹^{a}	۸۸^{e}	۴۲^{c}

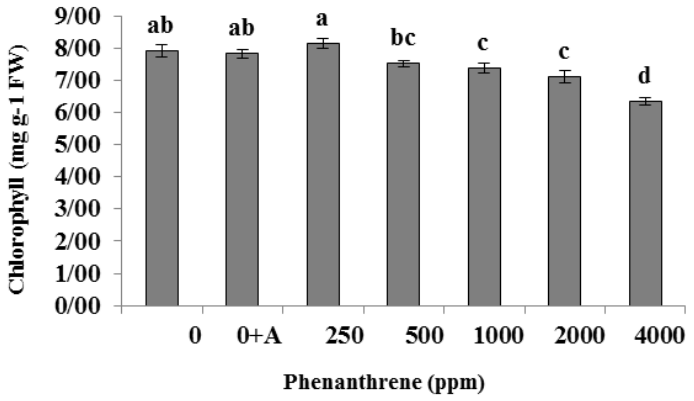
*در هر ستون حروف مشترک نشان‌دهنده عدم معنی‌داری است.

فنانترن در خاک باعث کاهش ناگهانی طول ریشه شده و در غلظت ۴۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک، تنش شدید فنانترن می‌تواند دلیل بر کاهش بیشتر طول ریشه باشد. در پژوهشی طول ریشه گیاه ذرت در آلودگی نفتی فنانترن مورد بررسی قرار گرفت و کاهش ۴۰ درصدی را نشان داد (Baoune *et al.*, 2019).

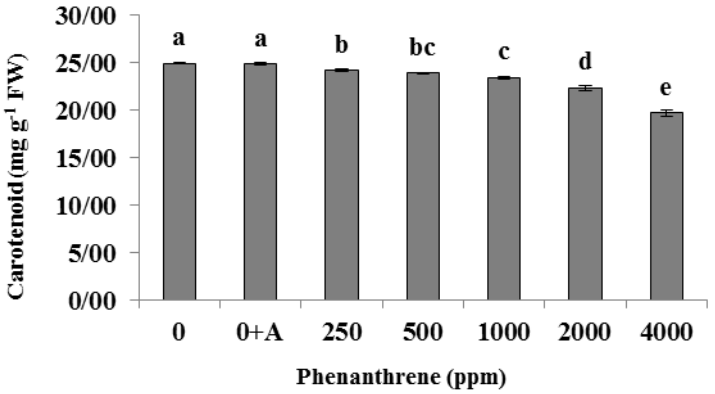
کلروفیل و کاروتنوئید: همان‌طور که در شکل ۱ و ۲ مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت فنانترن، میزان کلروفیل و کاروتنوئید روند کاهشی دارد و در غلظت ۴۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک که بالاترین غلظت فنانترن است، نسبت به گیاهان شاهد کاهش ۲۰ و ۲۱ درصدی به‌ترتیب در میزان کلروفیل و کارتنوئید مشاهده شد که می‌تواند به‌دلیل مقاومت بالای گیاه وتیور و تلاش برای فعالیت فتوسنتزی باشد. محتوای کلروفیل برگ‌ها به‌عنوان شاخصی برای تنش گیاهان در نظر گرفته می‌شود (Huang *et al.*, 2004). پژوهشی بر روی گیاه ذرت نشان داد که هیدروکربن‌های نفتی باعث کاهش معنی‌دار مقدار کلروفیل و کاروتنوئید می‌شوند که با روند پژوهش حاضر برای وتیور سازگار است (Baoune *et al.*, 2019). همچنین در گیاه یونجه غلظت ۴۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک فنانترن، باعث کاهش ۲۸ درصدی مقدار کلروفیل شده است (Li *et al.*, 2020). اما در پژوهش حاضر در غلظت ۴۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک فنانترن، کاهش میزان کلروفیل برگ در مقایسه با شاهد تنها ۲۰ درصد بود که نشان می‌دهد گیاه وتیور مقاومت فوق‌العاده‌ای در برابر آلاینده نفتی فنانترن از خود نشان داده است. اثر فنانترن بر روی آرابیدوپسیس، باعث سرکوب ژن‌های درگیر در چرخه کالوین، تنفس نوری و ساخت آمینواسیدها و نوکلئوتیدها می‌شود که کاهش میزان کلروفیل در پژوهش‌های مختلف را توجیه می‌کند. با گذشت زمان، به‌دلیل کاهش فعالیت فتوسنتزی ناشی از کاهش آنزیم‌ها و عملکرد آنها، گیاه وتیور سعی در حفظ میزان کلروفیل می‌نماید (Dumas *et al.*, 2016). در غلظت ۳۷ میلی‌گرم در کیلوگرم فنانترن وزن خشک خاک، هیچ تغییری در میزان کلروفیل گیاه نی مشاهده نمی‌شود درحالی‌که در همان غلظت در گیاه سودا (*Suaeda salsa*) ۷۳ درصد کاهش کلروفیل دیده می‌شود (Zhu *et al.*, 2014) که نشان می‌دهد گیاهان مختلف، مقاومت متفاوتی در برابر تنش آلاینده فنانترن نشان می‌دهند. گیاهان وتیور و نی که هر دو از خانواده گندمیان هستند، مقاوم به آلاینده‌های نفتی بوده و گیاه‌پالا هستند. **فعالیت آنزیم کاتالاز:** در شکل ۳ با افزایش غلظت فنانترن، میزان فعالیت آنزیم کاتالاز افزایش می‌یابد. سرعت این افزایش تا غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک فنانترن بسیار کند بود اما از غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک فنانترن،

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1401.11.48.7.8]



شکل ۱- اثر فنانترن خاک بر میزان کلروفیل گیاه وتیور. هر عدد نشان‌دهنده میانگین ± انحراف معیار. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار براساس آزمون (LSD) در سطح ۰/۰۵ = α است. بارها در هر ستون نمودار نشان‌دهنده خطای استاندارد است.

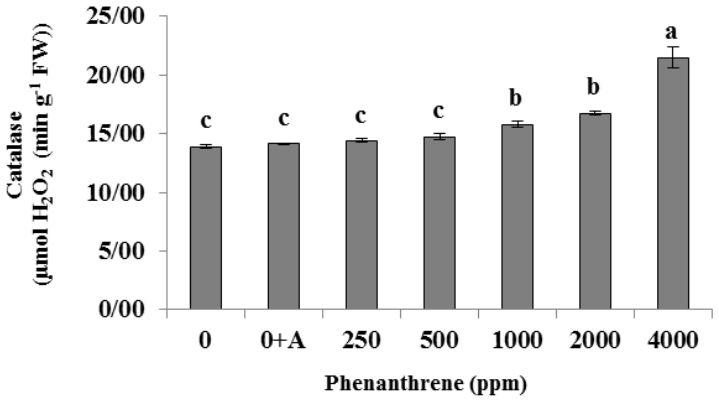


شکل ۲- اثر فنانترن خاک بر میزان کارتنوئید گیاه وتیور. هر عدد نشان‌دهنده میانگین ± انحراف معیار. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار براساس آزمون (LSD) در سطح ۰/۰۵ = α است. بارها در هر ستون نمودار نشان‌دهنده خطای استاندارد است.

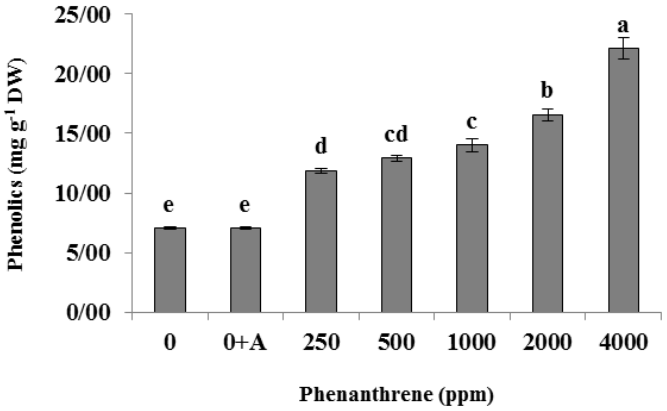
سرعت افزایش فعالیت آنزیم افزایش معنی‌دار داشت و بالاترین میزان فعالیت کاتالاز در غلظت ۴۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک فنانترن مشاهده شد که نسبت به تیمار ۲۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک فنانترن افزایش ۲۸ درصدی داشت که بیان‌کننده قدرت گیاه وتیور در غلظت بالای فنانترن جهت حذف رادیکال‌های آزاد است. گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در طی تنش‌ها در گیاهان تولید می‌شوند و می‌توانند به‌صورت رادیکال‌های سوپراکسید، باعث آسیب رساندن به بخش‌های مختلف سلول‌های گیاهی شوند. آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) اولین دفاع گیاهان در برابر ROS است که باعث تبدیل O_2^- به H_2O_2 و O_2 می‌شود (Alscher *et al.*, 2002). کاتالاز آنزیمی است که H_2O_2 را در سلول‌های گیاهی به آب و اکسیژن تبدیل می‌نماید (Li and Yi, 2012). البته پژوهش‌هایی از جوانه‌زنی بذر گندم نشان داده است که با افزایش غلظت فنانترن، میزان فعالیت کاتالاز کاهش می‌یابد (Wei *et al.*, 2014). دلیل این کاهش فعالیت می‌تواند به ضعیف بودن جوانه‌های تازه برگردد (سبحانی و همکاران، ۱۳۹۸).

ترکیبات فنولی: بر طبق شکل ۴ میزان ترکیبات فنولی در غلظت ۲۵۰ فنانترن، افزایش ۶۹ درصدی را نسبت به شاهد نشان داد. شیب این افزایش در غلظت‌های ۵۰۰ و فنانترن کم‌تر ولی در غلظت ۴۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک بیش‌ترین میزان فنول مشاهده شد و مقدار این ترکیبات نسبت ۱۰۰۰

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1401.11.48.7.8]



شکل ۳- اثر فنانترن خاک بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز گیاه وتیور. هر عدد نشان‌دهنده میانگین ± انحراف معیار. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار براساس آزمون (LSD) در سطح ۰/۰۵ = α است. بارها در هر ستون نمودار نشان‌دهنده خطای استاندارد است.



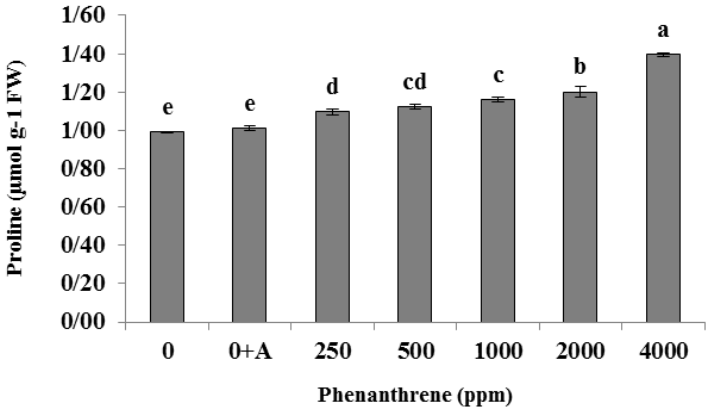
شکل ۴- اثر فنانترن خاک بر میزان ترکیبات فنولی گیاه وتیور. هر عدد نشان‌دهنده میانگین ± انحراف معیار. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار براساس آزمون (LSD) در سطح ۰/۰۵ = α است. بارها در هر ستون نمودار نشان‌دهنده خطای استاندارد است.

به شاهد تا سه برابر افزایش یافت. افزایش مقدار فنول در غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک، نشانگر تنش واردشده به گیاه است و در غلظت ۴۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک فنانترن، شدت بالای این تنش باعث افزایش چشمگیر این ترکیبات در گیاه شده که باعث مقاومت وتیور به تنش و حفاظت گیاه در برابر آن شده است. در شرایط تنش، در صورتی که ترکیبات فنولی افزایش پیدا نکند، رادیکال‌های آزاد تولیدشده طی تنش، باعث آسیب به بخش‌های مختلف سلول گیاهی مانند DNA، غشای سلولی و کلروپلاست‌ها می‌شود در نتیجه، افزایش فنول‌ها در غلظت‌های بالای فنانترن، باعث کاهش بسیار کم میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی کلروفیل و کاروتنوئید شده است. ترکیبات فنولی گروه بزرگی از متابولیت‌های ثانویه گیاهی هستند که نقش مهمی را در مقابله با تنش‌ها بازی می‌کنند. پژوهش‌ها نشان داده است که میزان این ترکیبات در گیاهان طی تنش‌ها افزایش می‌یابد. این ترکیبات می‌توانند گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) را خنثی نموده و از اثر تخریبی آن‌ها بر گیاه جلوگیری نمایند (Krol *et al.*, 2014). اگرچه بسیاری از تحقیقات افزایش چند برابری فنول‌ها طی تنش را گزارش کرده‌اند اما بعضی از پژوهش‌ها نیز نشان می‌دهد که افزایش فنول‌ها طی تنش‌ها در برخی گیاهان کمتر است (Ramakrishna and Ravishankar, 2011).

پرولین: با توجه به شکل ۵ با افزایش غلظت فنانترن در

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1401.11.48.7.8]



شکل ۵- اثر فنانترن خاک بر میزان پرولین گیاه وتیور. هر عدد نشان‌دهنده میانگین ± انحراف معیار. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار براساس آزمون (LSD) در سطح ۰/۰۵ = α است. بارها در هر ستون نمودار نشان‌دهنده خطای استاندارد است.

خاک، میزان پرولین افزایش یافت به‌طوری‌که از غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک تا ۲۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک فنانترن، یک روند افزایشی را نشان می‌دهد و در غلظت ۲۰۰۰، ۲۰ درصد افزایش پرولین نسبت به شاهد دیده می‌شود. در غلظت ۴۰۰۰ فنانترن، روند افزایش مقدار پرولین سریع‌تر شده و ۴۰ درصد افزایش پرولین را نسبت به شاهد نشان می‌دهد. انباشت پرولین در بافت‌های گیاهی یک نشانه مشخص از تنش‌های محیطی است (Jaleel *et al.*, 2007; Routley, 1966). تحقیقات نشان می‌دهد که پرولین نقشی سازگارکننده در تحمل گیاه در برابر تنش‌ها بازی می‌کند (Verbruggen and Hermans, 2008). علاوه بر نقش پرولین در برقراری تعادل اسمزی، تجمع پرولین تحت شرایط تنش در برقراری و ثبات ساختارهای سلولی (غشاها و پروتئین‌ها)، حذف رادیکال‌های آزاد، بافری نمودن پتانسیل احیایی سلول (Hayat *et al.*, 2012)، انتقال پیام درون سلول و تأمین منبع ذخیره کربن و نیتروژن مؤثر است (Celik and Unsal, 2013). کاهش حالت اسیدی سیتوپلاسم و نگهداری غلظت مناسب $NADP^+/NADPH$ درون سلول از دیگر نقش‌های پرولین در طول شرایط تنش محسوب می‌شود (Hare and Cress, 1997). ساختار سه بعدی پروتئین‌ها درنتیجه برهمکنش یونی، هیدروفوبیک/هیدروفیلیک و یا برهمکنش بین زنجیرهای جانبی آمینواسیدهای تشکیل‌دهنده آن‌ها شکل می‌گیرد. پرولین از طریق برهمکنش با اتصالات زنجیرهای جانبی پروتئین‌ها منجر به القای تغییرات فضایی در پروتئین آنزیم شده و بهبود فعالیت آنزیم و ثبات ساختار آن‌ها را در شرایط تنش موجب می‌شود (Hayat *et al.*, 2012). تحت تنش فلزات سنگین، میزان پرولین در وتیور تا پنج برابر افزایش یافته است (Banerjee *et al.*, 2016).

فنانترن: در پژوهش حاضر، در هیچ کدام از تیمارهای فنانترن، تجمع فنانترن در بخش هوایی مشاهده نشد اما با افزایش غلظت فنانترن، میزان آن در ریشه گیاه افزایش یافت. میزان تجمع فنانترن در تیمارهای مختلف ریشه گیاه وتیور برابر با ۱۳، ۳۱، ۸۴، ۲۳۴ و ۵۱۹ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌ترتیب برای غلظت‌های فنانترن ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم بود. گزارش‌ها درباره علت عدم حضور فنانترن در بخش هوایی گیاه متفاوت است. در پژوهشی بیان شده است که فنانترن با ضریب ۴/۴۶ برابر در ریشه ذخیره می‌شود و نمی‌تواند به سمت بخش‌های هوایی گیاه سورگوم حرکت کند که با یافته‌های پژوهش حاضر همسو است (علایی و همکاران، ۱۳۸۹). اما مطالعات دیگری نشان داده‌اند که فنانترن به مقدار کمی می‌تواند در بخش هوایی گیاه نیز تجمع یابد (Alsghayer *et al.*, 2020). با توجه به اینکه یکی از روش‌های گیاه‌پالایی در گیاهان، تخریب گیاهی (Phytodegradation) است، این احتمال وجود دارد که فنانترن پس از انتقال به بخش هوایی

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1401.11.48.7.8]

گیاه، در آنجا تجزیه‌شده و حتی به یک منبع کربنی برای گیاه تبدیل گردد. در سیستم تالاب مصنوعی با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم فنانترن، ریشه وتیور می‌تواند فنانترن را تا ۶۴ میلی‌گرم در کیلوگرم و ریشه گیاه نی می‌تواند آن را ۱۹۲ میلی‌گرم در کیلوگرم انباشت کند (Alsghayer *et al.*, 2020). با غلظت ۳۲۲ میلی‌گرم در کیلوگرم فنانترن در خاک، این ترکیب تا ۱۶/۵ میلی‌گرم در کیلوگرم در ریشه گیاه کلم انباشت می‌شود (Wei and Pan, 2010).

نتیجه‌گیری

هدف این پژوهش تأثیر آلاینده نفتی فنانترن بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه وتیور بوده است. این گیاه هم می‌تواند به‌عنوان گیاهی برای فضای سبز در محیط‌های با آلودگی نفتی بکار برده شود و هم نقش گیاه پالایی دارد. پژوهش اخیر نشان داد که گیاه وتیور نسبت به سایر گیاهان مقاومت استثنایی در برابر آلاینده نفتی فنانترن را دارا است. اگر چه شاخص‌های رشد و رنگیزه‌های فتوسنتزی وتیور در تنش آلاینده نفتی فنانترن روندی کاهشی داشت اما این کاهش نسبت به غلظت فنانترن بکار رفته و در مقایسه با سایر گیاهان بسیار کم بود. خصوصیات فیزیولوژیک گیاه وتیور شامل میزان پرولین، ترکیبات فنولی و فعالیت آنزیم کاتالاز با افزایش غلظت فنانترن موجود در خاک روند افزایشی داشت که بیانگر قدرت بالای گیاه وتیور در مقابله با تنش آلودگی نفتی است. با توجه به اینکه فنانترن بیشتر در ریشه گیاه انباشت شده است، ریشه دچار سمیت بیشتری شده و درنتیجه کاهش رشد بیشتری را نسبت به اندام هوایی نشان می‌دهد. کلروفیل کاهش داشته است اما اثر سمیت فنانترن بر بیوشیمی فتوسنتز هم صورت گرفته است. مانند زنجیره انتقال الکترون و چرخه کلوین حداکثر تجمع فنانترن در ریشه گیاه وتیور ۵۱۹ میلی‌گرم در کیلوگرم بود که در غلظت ۴۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک فنانترن خاک مشاهده شد. این روند افزایشی نشان داد که گیاه وتیور احتمالاً در غلظت‌های بالاتر از ۴۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک فنانترن نیز امکان زنده‌ماندن و جذب این آلاینده از خاک را دارا است. با توجه به مقاومت وتیور به غلظت‌های بالای فنانترن و تجمع در ریشه آن، می‌تواند به‌عنوان گزینه بسیار مناسبی برای فرآیند گیاه‌پالایی ترکیبات نفتی بکاربرده شود. همان‌طور که قبلاً ذکر گردید گیاه وتیور بذر تولید نمی‌کند و از طریق پاجوش تکثیر می‌شود لذا خطر گسترش خارج از کنترل را ندارد.

منابع

احمدی، ا. م. و بیدلی، ع. (۱۳۸۴) گیاه پالایی، روشی نوین در اصلاح خاک‌ها و آب‌های آلوده. چهارمین همایش بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران، کرمان، ایران.

بسالت‌پور، ع. ا.، حاج عباسی، م. ع.، درستکار، و. و ترابی، غ. (۱۳۸۹) اصلاح خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی و روش ترکیبی زمین پالایی – گیاه پالایی. مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، علوم آب و خاک ۵۳: ۱۴۲–۱۲۹.

سبحانی، ا.، صالحی لیسار، س. ی. و موافقی، ع. (۱۳۹۸) بررسی مقایسه‌ای تأثیر فنانترن و پیرن بر جوانه‌زنی، رشد و فعالیت آنزیم‌های پاداکساینده گیاهچه‌های گندم زراعی (*Triticum aestivum* L.). مجله علمی پژوهشی اکوفیزیولوژی گیاهی ۳۹: ۱۳۷–۱۲۶.

علایی، ا.، وکیلی، ف. و شریف، م. (۱۳۸۹) گیاه‌پالایی خاک‌های آلوده به فنانترن با استفاده از گیاه سورگوم. مجله محیط‌شناسی ۵۳: ۸۸–۷۹.

محسن‌زاده، س.، نادری، ن. و نظری، م. (۱۳۹۵) پاسخ‌های فیزیولوژیکی گیاه وتیور به شیرابه پسماند شهری. زیست‌شناسی گیاهی ایران ۲۸: ۹۶–۷۹.

نادری، ن.، نظری، م. و محسن‌زاده، س. (۱۳۹۲) رشد ریشه گیاه وتیور و نقش گیاه‌پالایی آن در پاسخ به غلظت‌های مختلف شیرابه پسماند شهری. نخستین همایش تخصصی زیست‌پالایی، تهران، ایران.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1401.11.48.7.8]

نظری، م.، نادری، ن. و محسن‌زاده، س. (۱۳۹۶) گیاه‌پالایی گیاه وتیور در پاسخ به غلظت‌های مختلف شیرابه پسماند شهری. اولین همایش ملی توسعه پایدار و مدیریت شهری، سیرجان، کرمان، ایران.

Abdel-Shafy, H. I. and Mansour, M. S. M. (2016) A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. Egyptian Journal of Petroleum 25: 107-123.

Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. Methods in Enzymology 105: 121-126.

Alkio, M., Tabuchi, T. M., Wang, X. and Colon-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.

Alscher, R. G., Erturk, N. and Heath, L. S. (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. Journal of Experimental Botany 53: 1331-1341.

Alsghayer, R., Salmiaton, A., Mohammad, T., Idris, A. and Ishak, C. F. (2020) Removal efficiencies of constructed wetland planted with *phragmites* and *vetiver* in treating synthetic wastewater contaminated with high concentration of PAHs. Sustainability 12: 3357-3375.

Arnon, A. N. (1967) Method of extraction of chlorophyll in the plants. Agronomy Journal 23: 112-121.

Athar, H. R., Ambreen, S., Javed, M., Hina, M., Rasul, S., Zafar, Z. U., Manzoor, H., Ogbaga, C. C., Afzal, M., Al-Qurainy, F. and Ashraf, M. (2016) Influence of sub-lethal crude oil concentration on growth, water relations and photosynthetic capacity of maize (*Zea mays* L.) plants. Environmental Science and Pollution Research International 23: 18320-18331.

Atlas, R. M. (1981) Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: An environmental perspective. Microbiological Reviews 45: 180-209.

Baderna, D., Maggioni, S., Boriani, E., Gemma, S., Molteni, M., Lombardo, A., Colombo, A., Bordonali, S., Rotella, G., Lodi, M. and Benfenati, E. (2011) A combined approach to investigate the toxicity of an industrial landfill's leachate: Chemical analyses, risk assessment and in vitro assays. Environmental Research 111: 603-613.

Banerjee, R., Goswami, P., Pathak, K. and Mukherjee, A. (2016) Vetiver grass: An environment clean-up tool for heavy metalcontaminated iron ore mine-soil. Ecological Engineering 90: 25-34.

Baoune, H., Aparicio, J. D., Acuna, A., Hadj-khelil, A. O. E., Sanchez, L., Polti, M. A. and Alvarez, A. (2019) Effectiveness of the *Zea mays-Streptomyces* association for the phytoremediation of petroleum hydrocarbons impacted soils. Ecotoxicology and Environmental Safety 184: 109591.

Barrs, H. D. and Weatherley, P. E. (1962) A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. Australian Journal of Biological Sciences 15: 413-428.

Bates, L. S. (1973) Rapid determination of free prolin for water stress studies. Plant and Soil 39: 205-207.

Boonyapookana, B., Parkpian, P., Techapinyawat, S., Delaune, R. D. and Jugsujinda, A. (2005) Phytoaccumulation of lead by sunflower (*Helianthus annus*), tobacco (*Nicotiana tabacum*), and vetiver (*Vetiveria zizanioides*). Journal of Environmental Science and Health 40: 117-137.

Brandt, R., Merkl, N., Schultze-Kraft, R., Infante, C. and Broll, G. (2006) Potential of vetiver (*Vetiveria zizanioides* (L.) Nash) for phytoremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soils in Venezuela. International Journal of Phytoremediation 8: 273-284.

Celik, O. and Unsal, S. G. (2013) Expression analysis of proline metabolism-related genes in salt-tolerant soybean mutant plants. Plant Omics Journal 6: 364-370.

Chandra, S., Sharma, R., Singh, K. and Sharma, A. (2013) Application of bioremediation technology in the environment contaminated with petroleum hydrocarbon. Annals of Microbiology 63: 417-431.

Cheng, H., Yang, X., Liu, A., Fu, H. and Wan, M. (2003) A study on the performance and mechanism of soil-reinforcement by herb root system. In: Proceedings of the 3th International Vetiver Conference, Guangzhou, China.

Coral, G. and Karagoz, S. (2005) Isolation and characterization of phenanthrene-degrading bacteria from a petroleum refinery soil. Annals of Microbiology 55: 255-259.

Du, L. V. and Truong, P. N (2003) Vetiver grass system for erosion control on severe acid sulfate soil in southern Vietnam. In: Proceedings of the 3th International Vetiver Conference, Guangzhou, China.

Dumas, A. S., Taconnat, L., Barbas, E., Rigaill, G., Catrice, O., Bernard, D., Benamar, A., Macherel, D., Amrani, E. A., and Berthome, R. (2016) Unraveling the early molecular and physiological mechanisms involved in response to phenanthrene exposure. BMC Genomics 17: 818.

Dupuy, J., Ouvrard, S., Leglize, P. and Sterckeman, T. (2015) Morphological and physiological responses of maize (*Zea mays*) exposed to sand contaminated by phenanthrene. Chemosphere 124: 110-115.

Gao, X., Ohlander, M., Jeppsson, N., Bjork, L. and Trajkovski, V. (2000) Changes in antioxidant effects and their relationship to phytonutrients in fruit of sea buckthourn (*Hippophae rhamnoides* L.) during maturation. Journal of Agriculture and Food Chemistry 48: 1458-1490.

Gentili, A. R., Cubitto, M. A., Ferrero, M. and Rodriguez, M. S. (2006) Bioremediation of crude oil polluted seawater

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1401.11.48.7.8]

by a hydrocarbon-degrading bacterial strain immobilized on chitin and chitosan flakes. International Biodeterioration and Biodegradation 57: 222-228.

Ghosh, P., Gupta, A. and Thakur, I. S. (2015) Combined chemical and toxicological evaluation of leachate from municipal solid waste landfill sites of Delhi, India. Environmental Science and Pollution Research 22: 9148-9158.

Hare, P. D. and Cress, W. A. (1997) Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. Plant Growth Regulator 21: 79-102.

Hasanuzzaman, M., Ueno, A., Ito, H., Yamamoto, Y., Yumoto, I. and Okuyama, H. (2007) Degradation of long-chain n-alkanes C_{36} and C_{40} by *Pseudomonas aeruginosa* strain WatG. International Biodeterioration and Biodegradation 59: 40-43.

Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M. N., Wani, A. S., Pichtel, J. and Ahmad, A. (2012) Role of proline under changing environments: A review. Plant Signaling and Behavior 7: 1456-1466.

Huang, X. D., El-Alawi, Y., Penrose, D. M., Glick, B. R. and Greenberg, B. M. (2004) Responses of three grass species to creosote during phytoremediation. Environmental Pollution 130: 453-463.

Jaleel, C. A., Gopi, R., Sankar, B., Manivannan, P., Kishorekumar, A., Sridharan, R. and Pan-neerselvam, R. (2007) Studies on germination, seedling vigor, lipid peroxidationand proline metabolism in *Catharanthus roseus* seedlings under salt stress. South African Journal of Botany 73: 190-195.

Jiang, M. and Zhang, J. (2002) Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. Journal of Experimental Botany 53: 2401-2410.

Kirk, J. L., Klironomos, J. N., Lee, H. and Trevors, J. T. (2005) The effects of perennial ryegrass and alfalfa on microbial abundance and diversity in petroleum contaminated soil. Environmental Pollution 133: 455-465.

Krol, A., Amarowicz, R. and Weidner, S. (2014) Changes in the composition of phenolic compounds and antioxidant properties of grapevine roots and leaves (*Vitis vinifera* L.) under continuous of longterm drought stress. Acta Physiologiae Plantarum 36: 1491-1499.

Lamichhane, S., BalKrishna, K. C. and Sarukkalige, R. (2016) Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) removal by sorption: A review. Chemosphere 148: 336-353.

Lasat, M. M. (2002) Phytoextraction of toxic metals: A review of biological mechanisms. Journal of Environmental Quality 31: 109-120.

Li, L. H. and Yi, H. L. (2012) Effect of sulfur dioxide on ROS production, gene expression and antioxidant enzyme activity in *Arabidopsis* plants. Plant Physiology and Biochemistry 58: 46-53.

Li, L., Zhu, P., Wang, X. and Zhang, Z. (2020) Phytoremediation effect of *Medicago sativa* colonized by *Piriformospora indica* in the phenanthrene and cadmium cocontaminated soil. BMC Biotechnology 20: 20.

Li, Y. T., Li, F. B., Chen, J. J., Yang, G. Y., Wan, H. F., Zhang, T. B., Zeng, X. D. and Liu, J. M. (2008) The concentrations, distribution and sources of PAHs in agricultural soils and vegetables from Shunde, Guangdong, China. Environmental Monitoring and Assessment 139: 61-76.

Litchtenthaler, H. K. and Wellburn, A. R. (1983) Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. Biochemical Society Transaction 603: 591-592.

Liu, H., Weisman, 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.

Louvado, A., Gomes, N. C. M., Simoes, M. M. Q., Almeida, A., Cleary, D. F. R. and Cunha, A. (2015) Polycyclic aromatic hydrocarbons in deep sea sediments: Microbe-pollutant interactions in a remote environment. Science of the Total Environment 526: 312-328.

Makris, K. C., Shakya, K. M., Datta, R., Sarkar, D. and Pachanoor, D. (2007) Chemically catalyzed uptake of 2,4,6-trinitrotoluene by *Vetiveria zizanioides*. Environmental Pollution 148: 101-106.

Moore, G., Sanford, P. and Wiley, T. (2006) Vetiver grass (*Vetiveria zizanioides*). Department of Agriculture and Food Western Australia, Bulletin 4690, Perth.

Muratova, A., Golubev, S., Wittenmayer, L., Dmitrieva, T., Bondarenkova, A., Hirche, F., Merbach, W. and Turkovskaya, O. (2009) Effect of the polycyclic aromatic hydrocarbon phenanthrene on root exudation of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. Environmental and Experimental Botany 66: 514-521.

Pereira, R. C., Monterroso, C. and Macias, F. (2010) Phytotoxicity of hexachlorocyclohexane: Effect on germination and early growth of different plant species. Chemosphere 79: 326-33.

Pinyakong, O., Tiangda, K., Iwata, K. and Omori, T. (2012) Isolation of novel phenanthrene-degrading bacteria from seawater and the influence of its physical factors on the degradation of phenanthrene. Science Asia 38: 36-43.

Polti, M. A., Atjian, M. C., Amoroso, M. J. and Abate, C. M. (2011) Soil chromium bioremediation: Synergic activity of actinobacteria and plants. International Biodeterioration and Biodegradation 65: 1175-1181.

Ramakrishna, A. and Ravishankar, G. A. (2011) Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. Plant Signaling and Behavior 6: 1720-1731.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1401.11.48.7.8]

Routley, D. G. (1966) Proline accumulation in wilted ladino clover leaves. Crop Science 6: 358-361.

Saeki, H., Sasaki, M., Komatsu, K., Miura, A. and Matsuda, H. (2009) Oil spill remediation by using the remediation agent JE1058BS that contains a biosurfactant produced by *Gordonia* sp. strain JE-1058. Bioresource Technology 100: 572-577.

Samanata, S. K., Chakraborti, A. K. and Jain, R. K. (1999) Degradation of phenanthrene by different bacteria: Evidence for novel transformation sequences involving the formation of 1-naphthol. Applied Microbiology and Biotechnology 53: 98-107.

Santos, E. C., Jacques, R. J. S., Bento, F. M., Peralba, M. D. C. R., Selbach, P. A., Sa, E. L. and Camargo, F. A. O. (2008) Anthracene biodegradation and surface activity by an iron-stimulated *Pseudomonas* sp. Bioresource Technology 99: 2644-2649.

Shu, W. (2003) Exploring the potential utilization of vetiver in treating acid mine drainage (AMD). In: Proceedings of the 3th International Vetiver Conference, Guangzhou, China.

Singh, S., Melo, J. S., Eapen, S. and D'Souza, S. F. (2008) Potential of vetiver (*Vetiveria zizanoides* L. Nash) for phytoremediation of phenol. Ecotoxicology and Environmental Safety 71: 671-676.

Su, D. C. and Wong, J. W. (2004) Selection of mustard oilseed rape (*Brassica juncea* L.) for phytoremediation of cadmium contaminated soil. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 72: 991-998.

Subramaniam, K., Stepp, C., Pignatello, J. J., Smets, B. and Grasso, D. (2004) Enhancement of polynuclear aromatic hydrocarbon desorption by complexing agents in weathered soil. Environmental Engineering Science 21: 515-523.

Takdastan, A., Kardani, M. and Janadeleh, H. (2017) Removal of total petroleum hydrocarbons from polluted urban soils of the outskirts of Ahvaz, southwestern Iran. International Journal of Human Capital in Urban Management 2: 155-162.

Tang, S., Xi, L., Zheng, J. and Li, H. (2003) Response to elevated CO_2 of Indian mustard and sunflower growing on copper contaminated soil. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 71: 988-997.

Truong, P. and Baker, D. (1996) Tolerance of vetiver grass to some adverse soil conditions. In: Proceedings of the 1st International Vetiver Conference of a miracle grass, Bangkok, Thailand.

Truong, P. and Baker, D. (1998) Vetiver grass for stabilization of acid sulfate soils. In: Proceedings of 2nd National Conference of Acid Sulfate Soils, Coffs Harbour, Australia.

Truong, P. N. V. (2004) Vetiver grass technology for mine tailings rehabilitation. In: Proceedings of the 1st Asia-Pacific Conference on Ground and Water Bio-Engineering.

Truong, P. T., Van, T. and Pinners, E. (2009) Introduction to vetiver grass and its properties. Iranian Agricultural Sciences 1-172.

Vanova, L., Kummerova, M., Klems, M. and Zezulka, S. (2009) Fluoranthene influences endogenous abscisic acid level and primary photosynthetic processes in pea (*Pisum sativum* L.) plants in vitro. Plant Growth Regulation 57: 39-47.

Varjani, S. J. (2017) Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. Bioresource Technology 223: 277-286.

Varjani, S. J. and Upasani, V. N. (2016) Biodegradation of petroleum hydrocarbons by oleophilic strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514. Bioresource Technology 222: 195-201.

Varjani, S. J., Rana, D. P., Jain, A. K., Bateja, S. and Upasani, V. N. (2015) Synergistic ex-situ biodegradation of crude oil by halotolerant bacterial consortium of indigenous strains isolated from on shore sites of Gujarat, India. International Biodeterioration and Biodegradation 103: 116-124.

Verbruggen, N. and Hermans, C. (2008) Proline accumulation in plants: A review. AminoAcids 35: 753-759.

Waigi, M. G., Kang, F., Goikavi, C., Ling, W. and Gao, Y. (2015) Phenanthrene biodegradation by sphingomonads and its application in the contaminated soils and sediments: A review. International Biodeterioration and Biodegradation 104: 333-349.

Wei, H., Song, S., Tian, H. and Liu, T. (2014) Effects of phenanthrene on seed germination and some physiological activities of wheat seedling. Comptes Rendus Biologies 337: 95-100.

Wei, S. and Pan, S. (2010) Phytoremediation for soils contaminated by phenanthrene and pyrene with multiple plant species. Journal of Soils and Sediments 10: 886-894.

Wilkes, H., Buckel, W., Golding, B. T. and Rabus, R. (2016) Metabolism of hydrocarbons in n-alkane-utilizing anaerobic bacteria. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology 26: 138-151.

Zhang, Z., Hou, Z., Yang, C., Ma, C., Tao, F. and Xu, P. (2011) Degradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by a newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* DQ8. Bioresource Technology 102: 4111-4116.

Zhu, L., Chen, Z., Wang, J., Ding, J., Yu, Y., Li, J., Nengwen, X., Jiang, L., Zheng, Y. and Rimmington, G. M. (2014) Monitoring plant response to phenanthrene using the red edge of canopy hyperspectral reflectance. Marine Pollution Bulletin 86: 332-341.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1401.11.48.7.8]

Effect of phenanthrene oil pollutant on physiological and biochemical characteristics of vetiver plant (*Chrysopogon zizanioides*)

Nadereh Naderi[1], Sasan Mohsenzadeh[*1], Ali Moradshahi[1], Hajar Zamani[1] and Mehdi Zarei[2]

[1]Department of Biology, Faculty of Science, Shiraz University
[2]Department of Soil Science and Engineering, Faculty of Agriculture, Shiraz University
(Received: 27/11/2021, Accepted: 19/01/2022)

Abstract

Vetiver plant belongs to Poaceae family with high resistance, environmental compatibility and high ability for pollution absorption, therefore it can be used in environmental pollutions removal processes. Among petroleum compounds, polycyclic aromatic hydrocarbons are known as primary pollutants due to their stability in the environment. Phenanthrene usually has the highest concentration and most polluting among the petroleum aromatic compounds. In this study, vetiver was planted in pot with phenanthrene concentrations of zero (negative control), zero with acetone (positive control), 250, 500, 1000, 2000 and 4000 mg/kg soil dry weight and its physiological effects were investigated. At the highest concentration of phenanthrene the amount of chlorophyll and carotenoids decreased 20% and 21%, respectively, but phenolic compounds, proline and antioxidant activity were increased. Root and shoot weights at a concentration of 250 mg phenanthrene were significantly reduced compared to the control, but at subsequent concentrations, their decreasing slope were reduced. Root length and root volume also decreased. As phenanthrene was accumulated in root, it caused more decreases compare to shoot. Maximum accumulation of phenanthrene in vetiver root was 519 ppm in 4000 mg/kg soil dry weight phenanthrene concentration. Due to the resistance of vetiver to high concentrations of phenanthrene and its accumulation in roots, this plant can be used as a very suitable plant for the phytoremediation process of petroleum compounds.

Keywords: Petroleum pollution, Physiological effects, Phytoremediation, Aromatic hydrocarbons, Poaceae

Corresponding author, Email: mohsenz@shirazu.ac.ir

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1401.11.48.7.8]