

بررسی میزان تحمل گیاه خرفه (*Portulaca oleracea L.*) به تنش کروم بر اساس رشد،

شاخص های فتوسنتز و میزان فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان

راهله رهباریان^{۱*}، الهام عزیزی^۲، آسیه بهداد^۲، آتنا میریلوک^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۳

چکیده

به منظور بررسی اثرات تنش کروم بر رشد، شاخص های فتوسنتز و میزان فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان گیاه خرفه، آزمایشی در گلخانه تحقیقاتی، در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار سطح کروم (۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ پی پی ام) انجام شد. براساس نتایج، انباشت Cr^{2+} در ریشه بیش تر از اندام هوایی بود. هدایت روزنه ای، کلروفیل *a*، کاروتنوئید، تعلق و کارایی فتوسیستم II با افزایش میزان کروم کاهش یافت. هر چند، میزان تثبیت دی اکسید کربن، کارایی مصرف آب، رشد، ضریب ثبات کلروفیل و میزان کلروفیل *b* و کل در غلظت ۱۰۰ پی پی ام بیشتر از غلظت ۷۵ پی پی ام بود. میزان فعالیت آنزیم های کاتالاز و پراکسیداز با افزایش میزان کروم روند افزایشی نشان داد. بنابراین، احتمالاً کروم در غلظت های پایین، سبب کاهش کارایی فتوسنتز، تولید گونه های اکسیژن فعال و در نتیجه کاهش رشد شده است، ولی در سطوح بالاتر (۱۰۰ پی پی ام)، خرفه توانسته است با افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان تا حدودی اثرات تخریبی را کاهش دهد.

واژه های کلیدی: پراکسیداز، فلزات سنگین، کارایی فتوسیستم II، کلروفیل.

مقدمه

کروم هفتمین عنصر فراوان روی کره زمین و یکی از مهمترین آلاینده های محیطی است که طی فرآیندهای وسیع صنعتی به خاک رها می شود (Aldoobie & Beltagi, 2013). چرم سازی و دباغی، صنایع استیل سازی، کاشی سازی و حفاری چاه ها با رهاسازی پساب های صنعتی به آب های جاری، بیشترین سهم را در آلودگی با کروم به عهده دارند (Hussein et al., 2014) با وجود این که کروم در گروه عناصر ضروری برای گیاهان قرار ندارد (Jianmin et al., 2012)، ولی ضرورت وجود کروم در تغذیه جانوران و تاثیر آن بر سلامت انسان ثابت شده است. Cr^{3+} یک جزء مهم در تعادل رژیم غذایی انسان و جانوران است

۱- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

* (نویسنده مسئول: Rahbarian.r@pnurazavi.ac.ir)

۲- دانشیار، گروه کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۳- دانشجوی دکتری فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

۴- دانشجوی دکتری شیمی و حاصلخیزی خاک، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

و کمبود آن موجب بروز اختلال در متابولیسم گلوکز و چربی ها و ایجاد علائم دیابت و بیماری های قلبی عروقی می گردد (Gonzalez *et al.*, 2015).

دامنه سمیت کروم از ۰/۵ تا ۵ میلی گرم بر لیتر در محلول غذایی و ۵ تا ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم در خاک برای گیاهان زراعی است. جذب و اثر منفی کروم بر گیاهان به فرم شیمیایی آن بستگی دارد. به طوری که Cr^{6+} شکل بسیار واکنش گر کروم است و Cr^{3+} حلالیت و سمیت کمتری در مقایسه با Cr^{6+} نشان می دهد. هر چند، برخی غلظت های کروم محرک رشد به ویژه جوانه زنی هستند. در حضور منگنز در خاک، کروم Cr^{3+} به کروم Cr^{6+} تبدیل می شود که برای مدت طولانی در خاک باقی می ماند و بر روی رشد و نمو گیاه تاثیر می گذارد (Rehana *et al.*, 2012). Behdani و همکاران (۲۰۱۴)، با بررسی غلظت عناصر کم مصرف و سنگین خاک در چند منطقه کاشت زعفران نشان دادند با افزایش سن مزرعه غلظت روی خاک کاهش و غلظت عناصر سنگین خاک شامل کبالت، کروم و کادمیوم افزایش می یابد. برخلاف سایر فلزات سنگین از قبیل کادمیوم، جیوه و آلومینیوم، تاثیر تنش کروم بر رشد و نمو گیاه کمتر مورد توجه دانشمندان و محققین قرار گرفته است (Olutoyosi *et al.*, 2012).

کروم مانند سایر تنش های غیرزیستی از جمله تنش شوری و خشکی بر مراحل مختلف رشد، شاخص های فتوسنتزی شامل تثبیت دی اکسید کربن، انتقال الکترون، فسفریلاسیون نوری و فعالیت های آنزیمی تاثیر می گذارد (Redondo-Gomez *et al.*, 2011; Rahbarian *et al.*, 2011). کروم به دلیل شباهت ساختاری با بعضی عناصر ضروری، تغذیه معدنی گیاه را نیز تحت تاثیر قرار می دهد (Subrahamayam, 2008). غلظت های بالای کروم بر روی رشد ریشه نیز تاثیر می گذارد و سبب پژمردگی و پلاسمولیز سلول های ریشه ای می گردد (Shamsu *et al.*, 2012). هم چنین Orhue و Uzu (۲۰۱۱) گزارش کردند که سمیت کروم باعث کاهش توده گیاهی، سطح برگ، تعداد برگ ها و وزن خشک ساقه کدو تنبل (*Telfairia occidentalis*) شده است. در بررسی اثر کروم بر فتوسنتز گیاه چای مشاهده شد که غلظت های بالای (۱ میلی مولار) کروم شش ظرفیتی می تواند سبب تخریب غشاء کلروپلاستی و کاهش میزان فتوسنتز در گیاه شود (Jianmin *et al.*, 2012). هم چنین کروم میزان آنزیم دلتا آمینولولوپتیک اسید دهیدراتاز کاهش می دهد. این آنزیم در مسیر بیوسنتز رنگدانه های فتوسنتزی از قبیل کلروفیل ها نقش مهمی ایفا می کند. بنابراین کروم از طریق مهار بیوسنتز کلروفیل سبب کاهش ظرفیت به دام اندازی نور و در نهایت کاهش فرایند فتوسنتز در گیاه می شود. علاوه بر این کروم می تواند باعث القای تجزیه کاروتنوئید ها در گیاه گردد (Shamsu *et al.*, 2012). هم چنین کروم می تواند سبب تغییر کلروپلاست و فراساختار غشا، پراکسیداسیون لیپیدهای غشا و کاهش فعالیت آسکوربات پراکسیداز در گیاهان شود (Olutoyosi *et al.*, 2012).

یکی از علت های مهم آسیب بافتی در گیاهانی که در معرض فلزات سنگین قرار می گیرند، افزایش گونه های اکسیژن واکنشگر (ROS) و ایجاد تنش اکسیداتیو است. ROS باعث ایجاد صدمات متعدد نظیر اکسیداسیون لیپیدهای غشا و تخریب

پروتئین ها، آنزیم ها، رنگدانه ها و ماکرومولکول ها و در نهایت اختلال در فرآیندهای مهم تنفس و فتوسنتز می شوند (Mishra *et al.*, 2006). سیستم دفاعی گیاه در مقابل خسارت اکسیداتیو شامل آنزیم های آنتی اکسیدان از جمله آسکوربات پراکسیداز (APX, EC 1.11.1.11)، کاتالاز (CAT, EC 1.11.1.6) و پراکسیداز (POD, EC 1.11.1.11) و ترکیبات غیر آنزیمی مثل آسکوربات و گلووتاتیون و ترکیبات فنلی می باشند. ترکیبات آنتی اکسیدان به عنوان دفاع اصلی موجب حذف ROS در بخش های مختلف سلول گیاهی می شوند. در نتیجه، تعادل بین میزان آنتی اکسیدان ها و محتوای ROS برای حفظ رشد طبیعی گیاه لازم است (Molassiotis *et al.*, 2005). بر طبق گزارش Zare و همکاران (۲۰۱۵) تنش کروم باعث افزایش در فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز در گیاه سورگوم (*Sorghum bicolor*) شد که می تواند دلیلی بر افزایش رادیکال های آزاد تحت تنش کروم باشد.

خرفه با نام علمی *Portulaca oleracea* L. گیاهی علفی و آبدار است که تقریباً در تمامی نقاط ایران پراکندگی دارد و در مناطق جنوبی ایران از جمله خوزستان به عنوان سبزی خوردن کاشته می شود. این گیاه به عنوان ضد درد، ضد تورم، ضد تب، شل کننده عضلانی، آنتی اکسیدان، تقویت سیستم ایمنی، تصفیه کننده خون و رفع تشنگی کاربرد درمانی دارد (Mubashir *et al.*, 2011). علاوه بر این، گیاه خرفه با جذب مقادیر بالای آب در اندام ها، قادر است غلظت های بالایی از فلزها را وارد بافت های خود کند. تحقیقات نشان داده است که این گیاه قادر به تجمع غلظت های بالایی از فلز سنگین کروم در بافت هایش است (Alyazouri *et al.*, 2013). هم چنین، Azizi و همکاران (۱۳۹۵) گزارش کردند که گیاه خرفه با داشتن فاکتورهای تجمع زیستی بیش تر از ۱ برای کروم، قابلیت رشد در خاک های آلوده به کروم را دارد و احتمالاً می تواند به عنوان یک گیاه بیش دهنده برای حذف آلودگی های ناشی از کروم شش ظرفیتی مورد استفاده قرار گیرد. از طرفی با توجه به خواص دارویی این گیاه و احتمال تجمع فلزات سنگین در ریشه آن، استفاده از اندام هوایی آن جهت مصارف دارویی کاربرد خواهد داشت (Mubashir, 2012; Uddin *et al.*, 2012). لذا در این پژوهش، سعی بر این بوده است که غلظت های کروم در خاک، ریشه و اندام هوایی تعیین کرده و با تاثیر غلظت های متفاوت فلز کروم بر رشد، پارامترهای فتوسنتزی، میزان پروتئین های محلول و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان، میزان تحمل گیاه خرفه به تنش کروم مورد سنجش و ارزیابی قرار گیرد و احتمال معرفی خرفه به عنوان کاندیدای مناسبی جهت گیاه پالایی خاک های آلوده به کروم بررسی گردد.

مواد و روش ها

کشت گلدانی گیاه و اعمال تیمارها

به منظور بررسی تاثیر غلظت های مختلف فلز کروم بر رشد، شاخص های فتوسنتزی و آنتی اکسیدانی، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد. هر واحد آزمایشی در این آزمایش

از یک گلدان به حجم ۳ لیتر تشکیل شد که از خاک مزرعه پر گردید و در آن، ۱۰ عدد بذر *P. oleracea* کاشته شد. برای تیمار کروم، از غلظت های ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی گرم نمک دی کرومات پتاسیم در یک کیلوگرم خاک استفاده شد. شرایط گلخانه با دمای روز ۲۴-۲۸ درجه سانتی گراد، دمای شب ۱۶-۲۰ سانتی گراد و رطوبت ۵۰ درصد با ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی ثابت نگه داشته و گلدان ها هر بار به میزان ۷۵ درصد ظرفیت مزرعه آبیاری شدند. ویژگی های فیزیکی و شیمیایی خاک در آزمایشگاه گروه خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد. به این منظور، خصوصیات خاک از جمله بافت خاک (Klute, 1986)، هدایت الکتریکی (Inbar et al., 1993)، اسیدیته (Inbar et al., 1993)، میزان پتاسیم قابل دسترس (Simard, 1993)، فسفر قابل دسترس (Olsen et al., 1954)، نیتروژن کل (Bremner & Mulvaney, 1982) و کروم قابل دسترس (James & Petura, 1995)، قبل از شروع آزمایش تعیین شد (جدول ۱).

جدول ۱: خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک قبل از شروع آزمایش

بافت خاک	میزان عناصر غذایی (ppm)				اسیدیته pH	هدایت الکتریکی EC (dS.m ⁻¹)
	پتاسیم قابل دسترس	فسفر قابل دسترس	نیتروژن کل	کروم قابل دسترس		
لوم-سیلنتی	۱۱۸	۷/۱	۲۹۸	۳/۴۷	۷/۷۵	۱/۱۴

گلدان ها در طی ۶۰ روز تا کامل شدن دوره رشد گیاه، ۸ مرتبه (هفته ای یک بار) تا حد ظرفیت مزرعه با محلول های دی کرومات پتاسیم و گلدان های شاهد با آب مقطر آبیاری شدند. پس از ۶۰ روز اندام های هوایی و ریشه گیاهان برداشت شدند. طول اندام هوایی و ریشه گیاه اندازه گیری شد، هم چنین وزن خشک اندام هوایی و ریشه پس از قرار گرفتن در آون (دمای ۷۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت) به طور جداگانه با ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱ تعیین شد.

تعیین غلظت کروم (VI) موجود در خاک

برای اندازه گیری کروم شش ظرفیتی از مخلوط کربنات سدیم ۰/۲۸ مولار و سود ۰/۵ مولار برای عصاره گیری از خاک استفاده شد و پس از سانتریفیوژ مقدار کروم شش ظرفیتی با استفاده از متد دی فنیل کربازاید در طول موج ۵۴۰ نانومتر با کمک دستگاه اسپکتروفوتومتر UV اندازه گیری شد (James & Petura, 1995).

تعیین غلظت کروم (VI) موجود در اندام های هوایی و ریشه های گیاه

نمونه های ریشه و اندام هوایی به صورت جداگانه در دمای ۷۵ درجه سانتی گراد و به مدت ۴۸ ساعت در آون قرار داده شدند. برای تعیین کروم شش ظرفیتی از هضم قلیایی با استفاده از روش EPA استفاده شد. نمونه ها پس از هضم با معرف ۵۱-دی فنیل کربازاید واکنش داده و میزان کروم شش ظرفیتی با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر UV در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه گیری شدند (USEPA, 1996).

تعیین پارامترهای تثبیت کربن

میزان تثبیت دی اکسید کربن و میزان تعرق در ۱ سانتی متر مربع از سطح برگ جوان با دستگاه - Infra red Gas Analyzer IRGA, LCA4, ADC Bio Scientific Ltd., Herfordshire, UK) اندازه گیری شد. کارایی لحظه ای مصرف آب نیز از نسبت میزان اسیمیلاسیون دی اکسید کربن به میزان تعرق محاسبه شد (Ahmed *et al.*, 2002).

تعیین شاخص های فتوسنتزی

میزان کارایی فتوسیستم II ژنوتیپ ها بوسیله دستگاه کلروفیل فلورومتر اندازه گیری و ثبت شد. برای اندازه گیری میزان کارایی فتوسیستم II، ابتدا سطح برگ های جوان توسعه یافته با قرارگرفتن گیره بر روی آنها به مدت ۲۰ دقیقه در شرایط تاریکی قرار گرفت و سپس با اتصال رابط دستگاه به برگ و تنظیم دستگاه، کارایی فتوسیستم II، بوسیله دستگاه کلروفیل فلورومتر مدل OS5-FI اندازه گیری شد. نسبت Fv (تفاوت حداکثر فلئورسانس با حداقل فلئورسانس [Fm-F0]) به Fm (حداکثر فلئورسانس) توسط دستگاه اندازه گیری شد. کارایی فلئورسانس در غیاب نور فتوسنتزی است که همان حداقل فلئورسانس است که با استفاده از یک نور ضعیف ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) اندازه گیری شد. Fm (حداکثر فلئورسانس) با استفاده از یک نور اشباع ($8000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) به مدت ۰/۸ ثانیه اندازه گیری شد (Maxwell & Johnson, 2000).

سنجش میزان کلروفیل ها و کاروتنوئیدها

برای سنجش میزان کلروفیل ها و کاروتنوئیدها از روش Lichtenthaler (۱۹۸۷) استفاده شد. به این منظور ابتدا ۰/۱ گرم برگ با ۴ میلی لیتر استن ۸۰ درصد سائیده شد و جذب محلول رویی جهت تعیین میزان کلروفیل ها و کاروتنوئید توسط اسپکتروفتومتر در طول موج های ۶۴۷، ۶۶۴ و ۴۷۰ نانومتر قرائت گردید. میزان کلروفیل کل، کلروفیل a و کاروتنوئیدها از طریق معادله های زیر محاسبه گردید.

$$\text{معادله (۱)} \quad \text{b کلروفیل (Chlb) (mg/ml)} = \frac{21}{21A_{647} - 5/1A_{664}} \quad (1)$$

$$\text{معادله (۲)} \quad \text{a کلروفیل (Chla) (mg/ml)} = \frac{12}{25A_{664} - 664A_{647}} \quad (2)$$

$$\text{معادله (۳)} \quad \text{کلروفیل کل (TChl) (mg/ml)} = \text{chla} + \text{chlb} \quad (3)$$

$$\text{معادله (۴)} \quad \text{کاروتنوئید (mg/ml)} = \frac{(1000 A_{470} - 1/8 \text{ chla} - 85/0.2 \text{ chlb})}{198} \quad (4)$$

$$\text{معادله (۵)} \quad \text{CSI} = \frac{\text{کلروفیل کل در شرایط بدون تنش}}{\text{کلروفیل کل در شرایط تنش}} \times 100 \quad (\text{Sairam et al., 1997}) \quad (5)$$

A_{647} : میزان جذب نوری در طول موج ۶۴۷ نانومتر، A_{664} : میزان جذب نوری در طول موج ۶۶۴ نانومتر و A_{470} : میزان جذب نوری در طول موج ۴۷۰ نانومتر می باشد.

تعیین غلظت پروتئین محلول

برای سنجش پروتئین محلول از روش Lowry و همکاران (۱۹۵۱) استفاده شد، استخراج پروتئین های محلول به وسیله ی بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار با pH= ۷/۴ و با نسبت استخراج (w:v) ۱:۲۰ صورت گرفت. از آلبومین سرم گاوی با غلظت ۱ میلی گرم در میلی لیتر به منزله استاندارد استفاده و قرائت نوری در طول موج ۷۵۰ نانومتر انجام شد.

اندازه گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز

برای سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز، ۲ میلی لیتر تامپون استات ۰/۲ مولار (pH=۵) با ۰/۲ میلی لیتر آب اکسیژنه ۰/۳ درصد و ۰/۱ میلی لیتر بنزیدین ۰/۰۲ مولار محلول در متانول ۵۰ درصد در حمام یخ مخلوط شدند و سپس ۰/۱ ملی لیتر عصاره آنزیمی به آن اضافه شد و جذب نمونه های به مدت ۳ دقیقه در طول موج ۵۳۰ نانومتر خوانده شد. پس از رسم منحنی تغییرات جذب، فعالیت آنزیم بر حسب تغییرات واحد جذب در دقیقه به ازای هر گرم پروتئین محاسبه شد (Holy, 1972).

اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز

تعیین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز به روش Chandlee و Scandalios (۱۹۸۴) انجام شد. ابتدا ۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم ۰/۵ مولار (pH=۷) و ۰/۳ میلی لیتر آب اکسیژنه ۳ درصد در حمام یخ با یکدیگر مخلوط شدند و بلافاصله ۰/۲ میلی لیتر عصاره آنزیمی به آن اضافه شد. منحنی تغییرات جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر به مدت ۳ تا ۴ دقیقه بررسی شد. فعالیت آنزیم بر حسب تغییرات واحد جذب در دقیقه به ازای هر گرم پروتئین محاسبه شد.

تحلیل داده ها

پس از اندازه گیری صفات مورد بررسی، تجزیه و تحلیل آماری داده ها با سه تکرار بوسیله نرم افزارهای JMP و MSTAT C صورت گرفت و سپس نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel ترسیم شد.

نتایج و بحث

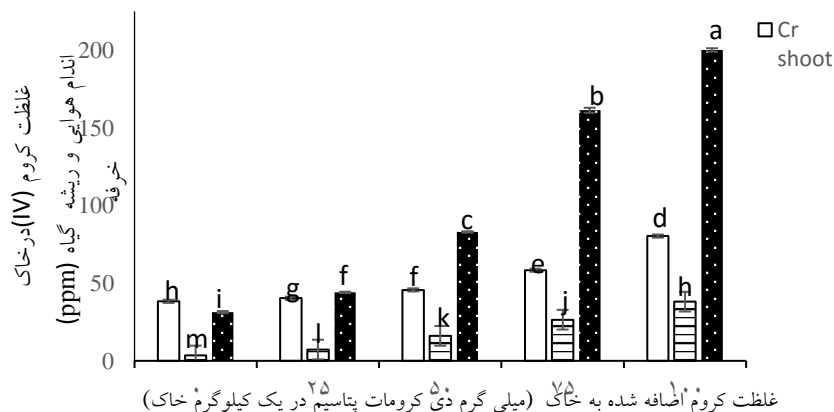
غلظت کروم (VI) در خاک، اندام هوایی و ریشه ی گیاه

براساس نتایج پژوهش حاضر با افزایش غلظت کروم در محیط کشت گیاه خرفه، غلظت کروم شش ظرفیتی در اندام هوایی، ریشه و خاک نیز به طور معنی داری افزایش یافت ($P < 0/01$) (شکل ۱). این روند افزایشی در نمونه های ریشه و خاک مشخص تر بود. به طوری که میزان کروم شش در نمونه های خاک، اندام هوایی و ریشه گیاهان کاشته شده در سطح ۱۰۰ پی پی ام به ترتیب حدود ۱۱، ۲ و ۶/۵ برابر محتوای کروم موجود در نمونه های شاهد بود. هم چنین، با مقایسه غلظت های کروم در نمونه ها

مشخص شد که غلظت کروم در ریشه خرفه بیش از بخش هوایی و خاک بود. بر اساس شکل ۱، در غلظت ۱۰۰ پی پی کروم، میزان کروم موجود در ریشه به ترتیب حدود ۲/۵ و ۵ برابر محتوای کروم در اندام هوایی و خاک است

مطابق با نتایج این تحقیق، با افزایش غلظت کروم در محیط، میزان این فلز در بافت گیاه به طور معنی داری افزایش یافت (Khavarinejad *et al.*, 2016). انباشت کروم در بخش های مختلف گیاه، متفاوت است. از بین این بخش ها درخرفه ریشه ها بیشترین مقدار جذب را دارند. تجمع بیش تر کروم در ریشه گیاهان نسبت به بخش های هوایی توسط Pirooz و همکاران (۲۰۱۲) روی گیاه آفتابگردان و Dogo و همکاران (۲۰۱۱) روی گیاه نعنای گزارش شد. این نتایج با نتایج گزارش شده در مورد گیاهان گندم، ذرت و گل کلم نیز مطابقت داشت (Sharma *et al.*, 2003); (Vajpayee *et al.*, 2000); Kim و همکاران (۲۰۰۳) تجمع ۳۳۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم کروم در ریشه ها و ۲۱۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم کروم در اندام های هوایی گیاه *Leersia hexandra* را گزارش کردند.

کروم ابتدا بواسطه سیستم ریشه ای از خاک گیاهان جذب و در غلظت های بالایی در بافت های ریشه ذخیره می شود، زیرا در انتقال کروم از ریشه به اندام هوایی محدودیت وجود دارد که دلیل این امر اتصال یون کروم در جایگاه های تبادلی کاتیونی در ریشه و در نتیجه غیر متحرک شدن آن می باشد (Vajpayee *et al.*, 2000). جذب کروم به وسیله ی بافت های گیاهی به طور مثبت با محتوای این فلز در خاک مرتبط بود (Shanker *et al.*, 2005). با توجه به نتایج، میزان کروم در خاک نسبت به مقدار این فلز در ریشه و اندام هوایی کم تر است، یکی از دلایل کاهش میزان کروم شش در خاک، جذب آن ها به وسیله ی ریشه و انتقال قسمت ناچیزی از کروم به اندام هوایی است (Azizi *et al.*, 2016). هم چنین ممکن است کروم (VI) به فرم کروم (III) در خاک تبدیل شود که کروم (III) به دلیل سمیت کم تر مورد اندازه گیری قرار نگرفت. بنابراین، با توجه به تجمع بسیار بالاتر کروم در ریشه نسبت به اندام های هوایی گیاه خرفه، به نظر می رسد در این تحقیق کلیت شدن و کده بندی یون های کروم در ریشه یک مکانیسم مقاومتی است که گیاه خرفه در تنش فلز سنگین کروم اتخاذ کرده است .



شکل ۱: غلظت کروم (VI) در خاک، اندام هوایی و ریشه گیاه خرفه تیمار شده با غلظت های مختلف کروم

ستون هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند مطابق آزمون LSD اختلاف معنی داری ندارند ($P < 0.05$)

اثر سطوح مختلف کروم بر شاخص های رشد

نتایج این بررسی نشان داد که غلظت های مختلف کروم سبب تغییرات معنی داری در رشد گیاه نسبت به شاهد ($P < 0/05$) شد (جدول ۲). بیشترین میزان طول اندام هوایی و ریشه در گیاهان شاهد و کمترین میزان آن در گیاهان کاشته شده در خاک با غلظت ۷۵ پی پی ام مشاهده شد (جدول ۲). به طوری که، در غلظت ۱۰۰ پی پی ام کروم، افزایش چشمگیری در میزان طول اندام هوایی و ریشه نسبت به غلظت ۵۰ پی پی ام و ۷۵ پی پی ام کروم وجود داشت و میزان طول اندام هوایی و ریشه در گیاهان با غلظت ۱۰۰ پی پی ام کروم نزدیک به مقدار آن ها در گیاهان شاهد شد (جدول ۲). طبق نتایج مندرج در جدول ۲، وزن خشک اندام هوایی و ریشه نیز روند کاهشی مشابهی با طول اندام هوایی و ریشه داشتند، به طوری که وزن خشک اندام هوایی گیاه شاهد نسبت به وزن خشک اندام هوایی گیاهان کاشته شده در سطح ۷۵ و ۱۰۰ پی پی ام به ترتیب ۱۸/۵ و ۲ برابر بود. هم چنین بیش ترین و کم ترین وزن خشک ریشه به ترتیب مربوط به نمونه های شاهد (۰/۰۷۰ گرم) و تیمار در سطح ۷۵ پی پی ام کروم (۰/۰۰۷ گرم) بود.

در بررسی اثر کروم بر رشد و عملکرد گیاهان مشخص شد که عملکرد گیاهان، تحت تنش کروم کاهش می یابد. این نتایج در پژوهش های Subrahmanyam (۲۰۰۸) بر روی گندم (*Triticum sativum*) و Zou و همکاران (۲۰۰۹) بر روی ذرت (*Zea mays*) نشان داده شده است. کروم منجر به عدم توسعه و گسترش سیستم ریشه ای می گردد. با کاهش سطوح جذب کننده و تغییر در ساختار غشای سلولی، جذب آب کاهش می یابد. بنابراین محتوای آب گیاه افت می کند که این امر بر فرایندهای فیزیولوژیکی نظیر تعرق، تنفس و فتوسنتز اثر کرده و نهایتاً موجب کاهش رشد در سایر بخش های گیاه خواهد شد (Sanita et al., 2002). مهار رشد ریشه توسط کروم می تواند به علت سمیت کروم در تقسیم سلولی، ایجاد اختلال در روابط اسموتیک گیاه، کاهش جذب و تثبیت نیترات یا محدودیت در انتقال Ca^{+2} از طریق غشای پلاسمایی باشد (Lodeiro et al., 2008; Sanita et al., 2002; Orhue & Uzu, 2011). همکاران (۲۰۰۵)، کروم (VI) باعث کاهش در غلظت عناصر Cu, Ca, K, Mg, P, B در خاک های مربوط به سویای رشد یافته شد. هم چنین، کاهش زیست توده هوایی بدلیل کاهش رشد ریشه ها و به دنبال آن کاهش انتقال آب و مواد معدنی از ریشه ها به بخشهای هوایی گیاه می باشد (Khavarinejad et al., 2016). بنابراین، براساس نتایج مربوط به شاخص های رشد به نظر می رسد، گیاه تا سطح ۷۵ پی پی ام کروم را تحمل کرده و پس از آن مکانیسم های دفاعی خود را فعال نموده تا از این طریق نه تنها اثرات سو ایجاد شده را جبران کند، بلکه کاهش رشد ناشی از تنش کروم را نیز تا حدودی برطرف سازد.

جدول ۲: وزن خشک و طول اندام هوایی و ریشه ی گیاه خرفه تیمار شده با غلظت های مختلف کروم

وزن خشک ریشه (g)	طول ریشه (cm)	وزن خشک اندام هوایی (g)	طول اندام هوایی (cm)	کروم (ppm)
۰/۰۷ ^a ±۰/۰۱	۸/۰۰ ^a ±۰/۵۸	۰/۱۷ ^a ±۰/۰۴	۱۶ ^a ±۰/۵۸	۰
۰/۰۴ ^{ab} ±۰/۰۰	۵/۵۰ ^b ±۰/۲۹	۰/۰۳ ^{bc} ±۰/۰۱	۶ ^c ±۰/۰۰	۲۵
۰/۰۱ ^b ±۰/۰۰	۲/۹۰ ^c ±۰/۳۸	۰/۰۱ ^c ±۰/۰۰	۳/۰۳ ^d ±۰/۰۳	۵۰
۰/۰۱ ^b ±۰/۰۰	۲/۰۰ ^c ±۰/۵۰	۰/۰۱ ^c ±۰/۰۰	۲/۵ ^d ±۰/۳۱	۷۵
۰/۰۴ ^{ab} ±۰/۰۰	۵/۶۶ ^b ±۰/۳۳	۰/۰۹ ^b ±۰/۰۲	۱۰/۱۰ ^b ±۰/۵۵	۱۰۰

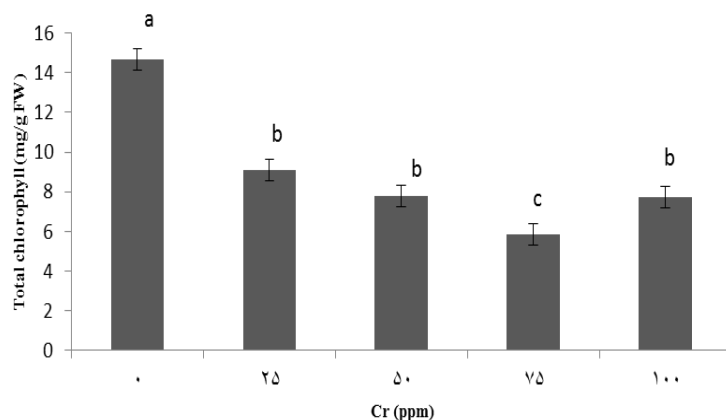
میانگین هایی که در هر ستون حداقل دارای یک حرف مشترک هستند مطابق آزمون LSD اختلاف معنی داری ندارند ($P < 0.05$)

اثر سطوح مختلف کروم بر میزان رنگیزه های فتوسنتزی

نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که با افزایش غلظت کروم در خاک از سطح صفر به ۱۰۰ پی پی ام میزان کلروفیل a و محتوای کاروتنوئیدی گیاهان مورد بررسی به طور معنی داری کاهش یافت ($P < 0.01$) (جدول ۳). به طوری که بیشترین و کمترین میزان کلروفیل a و کاروتنوئید به ترتیب مربوط به شرایط بدون کروم و تحت تنش ۱۰۰ پی پی ام بود (شکل ۳ و جدول ۵). میزان کلروفیل کل و b نیز در گیاهان تیمار شده نسبت به شاهد معنی دار بودند (جدول ۳). ولی بر خلاف روند موجود در کلروفیل a و کاروتنوئیدها، میزان کلروفیل کل و b در غلظت ۱۰۰ پی پی ام کروم، افزایش چشمگیری نسبت به غلظت ۵۰ پی پی ام و ۷۰ پی پی ام کروم نشان داد و میزان کلروفیل کل و b در گیاهان تیمار شده با غلظت ۱۰۰ پی پی ام کروم نزدیک به مقدار آن ها در گیاهان شاهد شد (شکل ۲ و جدول ۵). میزان کلروفیل کل و b در گیاهان شاهد به ترتیب ۲/۵ و ۵ برابر مقدار آن ها در گیاهان کاشته شده در خاک با غلظت ۷۵ پی پی ام بود (شکل ۲ و جدول ۵). بالاترین و پایینترین نسبت کلروفیل a/b به ترتیب مربوط به غلظت ۷۵ پی پی ام و ۱۰۰ پی پی ام بود. در گیاهان شاهد، نسبت کلروفیل a/b از گیاهان با غلظت های ۲۵، ۵۰ و ۷۵ پی پی ام پایین تر بود (جدول ۵). همبستگی مثبتی بین کروم و نسبت کلروفیل a/b مشاهده شد ($R^2 = 0.76$) (شکل ۴). در سطح شاهد میزان کلروفیل a و b تقریباً یکسان بوده است، بنابراین نسبت بین آنها نیز حدود یک است. با اعمال تنش روند کاهشی در هر دو نوع کلروفیل قابل مشاهده است ولی به دلیل کاهش شدیدتر میزان کلروفیل b نسبت به a تا سطح تنش ۷۵ روند افزایشی در نسبت کلروفیل a به b مشاهده شد (جدول ۵). همبستگی مثبتی بین میزان کلروفیل و میزان کاروتنوئید در گیاهان مورد بررسی مشاهده شد ($R^2 = 0.82$) (شکل ۵). ضریب ثبات کلروفیل نیز در غلظت های مختلف کروم متفاوت بود. غلظت ۷۵ پی پی ام کمترین و غلظت ۱۰۰ پی پی ام کروم بیشترین ضریب ثبات کلروفیل را به خود اختصاص دادند (جدول ۵).

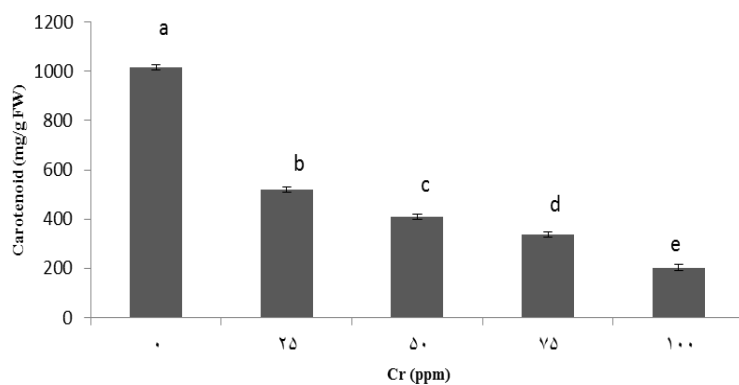
مطابق با نتایج این تحقیق، کاهش تدریجی میزان کلروفیل و کاروتنوئید در گیاهچه های سویا تحت تیمار با افزایش غلظت کروم نیز مشاهده شد (Sundarmoorthy et al., 2015). Zou و همکاران (۲۰۰۹) در مطالعه ای بر روی ذرت بیان کردند که کاهش محتوای کلروفیل در راستای افزایش کروم شش، مربوط به مهار مستقیم سنتر رنگیزه های فتوسنتزی است، به طوری که کروم جذب شده به وسیله گیاهان باعث مهار و تجزیه ی آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتز کلروفیل می شود و در نهایت، میزان کلروفیل کاهش می یابد. علاوه بر این کروم سبب افزایش تخریب کاروتنوئیدها نیز می گردد (Azmat et al., 2010). به

این ترتیب، Sundarmoorthy و همکاران (۲۰۱۵) بیان کردند که کاهش فعالیت آنزیم های دلتا آمینولولولینیک اسید دهیدروژناز و فتوکلرو فیلید ردوکتاز منجر به کاهش رنگیزه های فتوسنتزی در گیاه *Nymphaea alba* تحت تیمار با کروم شد. هم چنین، میزان بالای کروم از اتصال منیزیم درون مولکول پروتوپورفیرین جلوگیری می کند، در نتیجه محتوای رنگدانه های کلروفیل کاهش می یابد (Khavarinejad *et al.*, 2016). جانشینی فلزات سنگین با فلزات ضروری در سلول های گیاهی نیز رخ می دهد، از آنجائیکه فلزات ضروری در تشکیل رنگیزه ها و آنزیم ها نقش مهمی دارند بنابراین تشکیل رنگیزه ها دچار اختلال می شود (Barcelo & Poschenrieder, 2004). به طوری که Zou و همکاران (۲۰۰۶) نشان دادند که کروم به فرم شش ظرفیتی می تواند جایگزین یون های منیزیم در جایگاه فعال آنزیم های مختلف شود و محتوای کلروفیل و کاروتنوئید را کاهش دهد. بنابر نتایج حاصل از این بررسی می توان گفت که افزایش میزان کروم در خاک احتمالاً از طریق دخالت در مسیر بیوسنتز رنگیزه های فتوسنتزی سبب کاهش بیوسنتز و یا افزایش تخریب رنگیزه های فتوسنتزی شده و متعاقباً کارایی فتوسنتزی گیاه را کاهش داده است. Davies و همکاران (۲۰۰۲) کروم را بعنوان بازدارنده فتوسنتز و فتوسیستم II معرفی کرده اند که این بازدارندگی به تنش اکسیداتیو ناشی از تولید گونه های اکسیژن فعال (ROS) نسبت داده می شود. عملکرد فتوسیستم II از جمله مواردی است که به شدت تحت تاثیر تنش غیر زیستی قرار می گیرد، لذا میزان پلاستیدهای جدید، کلروفیل a و b و همچنین کاروتنوئید کاهش می یابد (Zarafshar *et al.*, 2015). با توجه به افزایش میزان کلروفیل کل و b در سطح ۱۰۰ پی پی ام نسبت به سطوح پایین تر کروم، می توان اینگونه نتیجه گیری نمود که احتمالاً این گیاه از طریق افزایش میزان کلروفیل کل و b، مکانیسم های دفاعی خود را جهت تحمل سطوح بالای تنش و کاهش تنش اکسیداتیو فعال می کند و حتی تا حدودی اثرات تخریبی ناشی از تنش جبران می شود. افزایش معنی دار میزان کلروفیل b در سطح تنش ۱۰۰ سبب کاهش شدید این نسبت a/b گردید که این افزایش می تواند به دلیل نقش محافظتی کلروفیل b در تنش اکسیداتیو ناشی از افزایش کروم باشد. احتمالاً گیاه خرفه از طریق افزایش میزان کلروفیل b توانسته است تا حدودی اثرات تخریبی ناشی از تنش کروم را کاهش دهد (Rahbarian *et al.*, 2011). نسبت کلروفیل a به b شاخص مناسبی جهت ارزیابی میزان تاثیر تنش های غیر زیستی بر گیاه می باشد. گزارش ها حاکی از آن است که کلروفیل b نسبت به تنش های غیر زیستی حساس تر از کلروفیل a است و کاهش شدیدتری در میزان آن در شرایط تنش مشاهده می شود. بنابراین نسبت کلروفیل a به b در شرایط تنش نسبت به گیاهان شاهد افزایش نشان می دهد (Ahmadi & Sio-Se Mardeh, 2004).



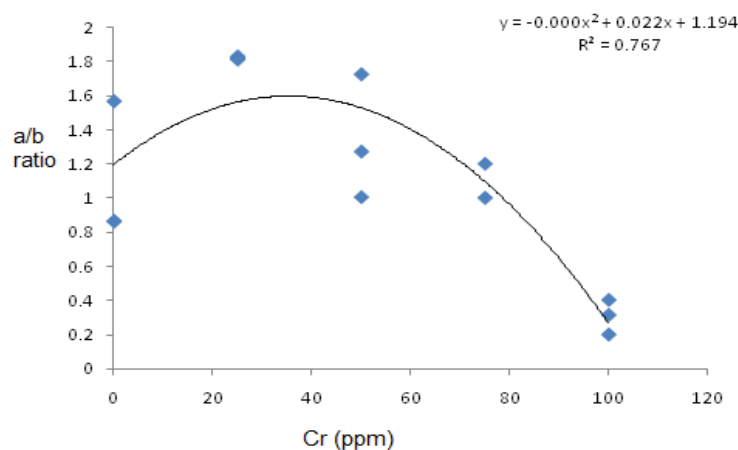
شکل ۲: اثر سطوح مختلف کروم بر میانگین مقدار کلروفیل کل در اندام هوایی گیاه خرفه

ستون هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند مطابق آزمون LSD اختلاف معنی داری ندارند ($P < 0.05$)

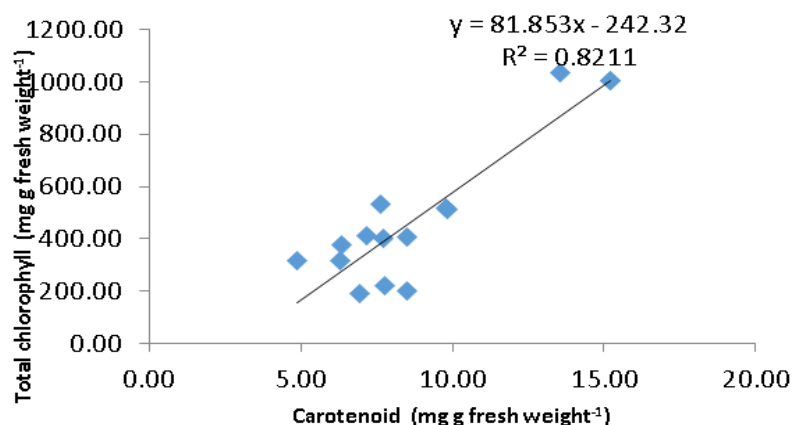


شکل ۳: اثر سطوح مختلف کروم بر میانگین مقدار کاروتنوئیدها در اندام هوایی گیاه خرفه

ستون هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند مطابق آزمون LSD اختلاف معنی داری ندارند ($P < 0.05$)



شکل ۴: رابطه همبستگی بین مقدار کروم و نسبت کلروفیل a به b در اندام هوایی گیاه خرفه



شکل ۵: رابطه همبستگی بین مقدار کاروتنوئیدها و کلروفیل کل در اندام هوایی گیاه خرفه

اثر سطوح مختلف کروم بر میزان کارایی فتوسیستم II و نرخ انتقال الکترون

نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که با افزایش غلظت کروم در خاک، میزان کارایی فتوسیستم II گیاه خرفه به طور معنی داری کاهش یافت ($P < 0/01$) (جدول ۳). به طوری که گیاهان در شرایط بدون کروم حداکثر میزان کارایی فتوسیستم II (۰/۹۳) و در خاک با غلظت ۱۰۰ پی پی ام کروم، کمترین میزان کارایی فتوسیستم II (۰/۶۲) را به خود اختصاص دادند (جدول ۵). گیاهان در شرایط غلظت ۵۰ و ۷۵ پی پی ام کروم از نظر میزان کارایی فتوسیستم II با یکدیگر تفاوت معنی داری نداشتند (جدول ۵). کروم اثر معنی داری بر میزان انتقال الکترون فتوسنتزی نداشت (جدول ۳). همچنین در گیاهان تحت تیمار با غلظت ۲۵ پی پی ام کروم میزان انتقال الکترون فتوسنتزی به طور معنی داری بیشتر از گیاهان تحت تیمار با غلظت ۷۵ پی پی ام کروم بود (جدول ۵). سایر سطوح کروم تفاوت معنی داری از نظر میزان انتقال الکترون فتوسنتزی نشان ندادند، همچنین کروم به طور معنی داری میزان کارایی فتوسیستم II را کاهش داد (جدول ۵). با توجه به افزایش میزان انتقال الکترون در رنجیره انتقال الکترون فتوسنتزی و کاهش کارایی فتوسنتزی با افزایش میزان کروم در خاک، می توان نتایج را اینگونه تفسیر نمود که به دلیل تخریب کلروفیل های a و b در فتوسیستمها تحت تنش کروم، انتقال الکترون در مسیر نوری فتوسنتز افزایش یافته ولی قسمتی از انرژی حاصل از مسیر انتقال الکترون به صورت فلئورسانس هدر رفته که باعث کاهش کارایی فتوسنتزی شده است و تعدادی از الکترون ها به مولکول های اکسیژن انتقال یافته اند که سبب تشکیل گونه های اکسیژن فعال و ایجاد استرس اکسیداتیو شده اند. Fv/Fm حداکثر کارایی کوانتومی سامانه نوری II است. کاهش Fv/Fm بیانگر اثر اکسیداتیو یا بازدارندگی نوری عوامل تنش زای محیطی از قبیل عناصر سنگین، روی فتوسیستم II می باشد (Maxwell & Johnson, 2000). کاهش Fv/Fm در پاسخ به افزایش کروم خاک با گزارش های سایر محققین در کاهو (Dias *et al.*, 2013) تحت تیمار با کادمیوم مطابقت داشت.

براساس نتایج این تحقیق، افزایش کروم به عنوان یک فلز سنگین در خاک سبب افزایش میزان جذب آن توسط گیاه

و در نتیجه افزایش غلظت این فلز در بافت های گیاهی می گردد. سمیت Cr^{6+} ناشی از فعالیت عوامل اکسیدکننده و شکل

گیری رادیکالهای آزاد درون سلولهای گیاهی می باشد (Shanker & Pathmanabhan, 2004). در بررسی های مشابه، رابطه خطی بین افزایش میزان کروم با شدت تنش اکسیداتیو توسط Zou و همکاران (۲۰۰۹) و Panda (۲۰۰۷) و Pandey و همکاران (۲۰۰۵) گزارش شده است. کروم شش باعث ایجاد تنش اکسیداتیو و افزایش تولید گونه های اکسیژن فعال می شود که این گونه های اکسیژن فعال از طریق افزایش تخریب رنگیزه های فتوسنتزی و یا مهار فعالیت آنزیم های دخیل در مسیر بیوسنتز رنگیزه های فتوسنتزی، همچنین از طریق آسیب به مولکولهای زیستی نظیر لیپیدها، پروتئین ها و بالاحص اسیدهای نوکلئیک، سبب کاهش میزان کارایی فتوسنتزی گیاه می گردند (Olutoyosi *et al.*, 2012). به دلیل قدرت اکسید کنندگی بالای کروم شش ظرفیتی، امکان افزایش میزان گونه های اکسیژن فعال از طریق انتقال الکترون های اضافی در مسیر نوری فتوسنتز به اکسیژن مولکولی وجود دارد (Liu *et al.*, 2008 ; Shamsu *et al.*, 2012). کروم هم چنین می تواند سبب تغییرات فراساختاری در کلروپلاست گردد و از این طریق سبب مهار فتوسنتز در سلول های گیاهی شود. غلظت های بالای کروم (۱ میلی مولار) سبب تخریب کامل غشاء کلروپلاستی و همچنین بهم ریختگی نظم تیلاکوئیدها می شود که نشان دهنده اثرات سمی کروم ۶ می باشد (Castro *et al.*, 2007)

جدول ۳: تجزیه واریانس میزان کارایی فتوسیستم II، انواع کلروفیل ها، نسبت کلروفیل a/b، کاروتنوئیدها و نرخ انتقال الکترون فتوسنتزی (ETR) در گیاه خرفه در شرایط تنش کروم

Sum square							dF	منابع تغییر
carotenoid	ETR	Total Chl	Chl.b	a/b ratio	Chl. a	Fv/Fm		
۲۹۱۸۸۹/۰۰**	۶۵/۲۷ns	۳۳/۷۶**	۱۸/۵۴**	۶۱/۱۸ ^{ns}	۱۲/۶۹**	۰/۰۵**	۴	Cr
۳۶۳	۱۲۰۷/۱۴	۰/۸۵	۲/۱۷	۱۸/۱۲	۰/۰۵	۰/۰۰	۲۰	Error
							۲۴	total

ns، * و **: به ترتیب نشان دهنده غیرمعنی داری و معنی داری در سطح احتمال ۰/۰۵ و ۰/۰۱ می باشد.

جدول ۴: تجزیه واریانس میزان اسیمیلاسیون دی اکسید کربن (A)، تعرق (E)، هدایت روزنه ای و کارایی لحظه ای مصرف آب (WUE) گیاه خرفه در شرایط تنش کروم

Sum square						dF	منابع تغییر	
Catalase	Protein peroxidase	WUE (mg/gFW)	Stomatal conductance (mmol m ⁻² s ⁻¹)	E (mmol m ⁻² s ⁻¹)	A (μmol m ⁻² s ⁻¹)			
**	۰/۴۸**	۰/۹ *	۷۱۶۵۹۵/۶۹**	۰/۰۵**	۰/۲۴**	۱/۱۹**	۴	Cr
۰/۰۱	۰/۰۰	۰/۱۸	۹۸۳۷۸/۹۴	۰/۰۲	۰/۵۸	۱/۴۴	۲۰	Error
						۲۴	total	

ns، * و **: به ترتیب نشان دهنده غیرمعنی داری و معنی داری در سطح احتمال ۰/۰۵ و ۰/۰۱ می باشد.

جدول ۵: تغییرات میانگین میزان کارایی فتوسیستم (Fv/Fm)II، نرخ انتقال الکترون فتوسنتزی (ETR)، کلروفیل a و b، ضریب ثبات کلروفیل (CSI)، نسبت کلروفیل a/b در گیاه خرفه تحت سطوح مختلف کروم

a/b	(%) CSI	Chl. b (mg/g fresh weight)	Chl. a (mg/g fresh weight)	Fv/Fm	Cr (ppm)
۱/۰۲ ^{bc} ± ۰/۳۱	۶۳ ^{ab}	۷/۰۶ ^a ± ۱/۱۰	۷/۲۳ ^a ± ۰/۱۸	۰/۹۳ ^a ± ۰/۰۲	شاهد
۲/۲۶ ^{ab} ± ۰/۸۸	۶۱/۹ ^{ab}	۲/۷۸ ^b ± ۰/۶۰	۶/۳۰ ^b ± ۰/۰۳	۰/۸۵ ^b ± ۰/۰۱	۲۵
۱/۲۷ ^{bc} ± ۰/۲۰	۵۳/۲۰ ^{ab}	۳/۴۲ ^b ± ۰/۴۰	۴/۳۷ ^c ± ۰/۰۸	۰/۷۱ ^c ± ۰/۰۰	۵۰
۳/۳۳ ^a ± ۱/۱۰	۳۸/۱۰ ^b	۱/۳۵ ^b ± ۰/۵۰	۴/۵۰ ^c ± ۰/۰۶	۰/۷۰ ^c ± ۰/۰۰	۷۵
۰/۲۸ ^c ± ۰/۶۰	۷۸/۴۰ ^a	۶/۶۰ ^a ± ۱/۱۰	۱/۸۸ ^d ± ۰/۱۷	۰/۶۲ ^d ± ۰/۰۱	۱۰۰

میانگین هایی که در هر ستون حداقل دارای یک حرف مشترک هستند مطابق آزمون LSD اختلاف معنی داری ندارند ($P < 0.05$)

جدول ۶: تغییرات میانگین میزان نرخ انتقال الکترون فتوسنتزی (ETR)، هدایت روزنه ای، کارایی مصرف آب (WUE)، تعرق (E) و اسیمیلاسیون دی اکسید کربن (A) در گیاه خرفه تحت سطوح مختلف کروم

A ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	E ($\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	WUE	stomatal conductance ($\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	ETR ($\mu\text{mol electron m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	Cr (ppm)
۸۲۱/۲۸ ^a ± ۳/۲۱	۰/۱۷ ^a ± ۰/۰۲	۰/۰۵ ^c ± ۰/۰۰	۰/۱۳ ^a ± ۰/۲۶	۱۸۹۲/۵۸ ^{ab} ± ۲/۳۶	شاهد
۸۶۸/۴۹ ^c ± ۱/۲۱	۰/۳۱ ^a ± ۰/۰۲	۰/۰۳ ^d ± ۰/۰۰	۰/۳۴ ^b ± ۰/۰۱	۱۹۰۳/۰۰ ^a ± ۰/۰۱	۲۵
۸۷۰/۹۳ ^c ± ۱/۶۱	۰/۳۰ ^b ± ۰/۰۴	۰/۰۳ ^d ± ۰/۰۱	۰/۲۲ ^c ± ۰/۰۱	۱۸۳۸/۷۶ ^{bc} ± ۱۳/۴۵	۵۰
۸۷۸/۹۰ ^b ± ۱/۲۹	۰/۱۶ ^c ± ۰/۰۳	۰/۰۶ ^b ± ۰/۰۰	۰/۱۴ ^e ± ۰/۰۰	۱۸۴۲/۱۸ ^{bc} ± ۱۴/۷۴	۷۵
۹۰۷/۱۲ ^a ± ۱/۱۳	۰/۰۵ ^d ± ۰/۰۳	۰/۱۷ ^a ± ۰/۰۱	۰/۱۸ ^d ± ۰/۰۱	۱۸۹۰/۵۶ ^{ab} ± ۱/۷۵	۱۰۰

میانگین هایی که در هر ستون حداقل دارای یک حرف مشترک هستند مطابق آزمون LSD اختلاف معنی داری ندارند ($P < 0.05$)

اثر سطوح مختلف کروم بر میزان تثبیت دی اکسید کربن

با افزایش غلظت کروم در خاک از سطح صفر به ۲۵ m پی پی ام، میزان تثبیت دی اکسید کربن نسبت به گیاهان شاهد به طور معنی داری افزایش نشان داد ($P < 0.05$) (جدول ۴). روند افزایشی میزان اسیمیلاسیون CO_2 ، با افزایش غلظت کروم تا سطح ۱۰۰ پی پی ام نیز ادامه یافت. به طوری که گیاهان در شرایط بدون کروم کمترین میزان تثبیت CO_2 و در غلظت ۱۰۰ پی پی ام بیشترین میزان تثبیت را به خود اختصاص دادند (جدول ۶). گیاهان با غلظت ۲۵ و ۵۰ پی پی ام تفاوت معنی داری از نظر میزان تثبیت دی اکسید کربن با یکدیگر نشان ندادند (جدول ۶).

براساس نتایج این تحقیق، کروم از طریق تاثیر بر فعالیت آنزیمها و تثبیت دی اکسید کربن، بر فتوسنتز گیاه تاثیر می گذارد. کروم در مقدار میکرومولار می تواند اثرات سمی بر فرایند فتوسنتز در سلول های گیاهی اعمال نماید و سبب تغییرات فراساختاری در کلروپلاست و در نتیجه آن مانع انجام عمل فتوسنتز در سلول های گیاهی گردد (Shamsu et al., 2012). کاهش اسیمیلاسیون دی اکسید کربن در شرایط تنش فلزات سنگین به دلیل ذخیره شدن و تجمع ATP و محدود شدن سنتز ریبولوز بیس فسفات و یا مهار فعالیت آنزیم های فتوسنتزی مثل روبیسکو می باشد. بنابراین فرآیند فتوسنتز تولید مجدد ریبولوز ۱و۵ بیس فسفات (ظرفیت کربوکسیلاسیون روبیسکو) را کنترل می کند. تولید مجدد ریبولوز ۱و۵ بیس فسفات از طریق غیر فعال شدن و یا کمتر شدن فعالیت آنزیم های سیکل کالوین و عدم مصرف ATP محدود می شود. افزایش میزان تثبیت دی اکسید

کربن در شرایط تنش در گیاه خرفه می تواند به دلیل فعال شدن پاسخ های دفاعی گیاه در برابر تنش باشد. بنابراین احتمالا گیاه خرفه در شرایط تنش کروم، مکانیسم های دفاعی از قبیل افزایش فعالیت آنزیم های دخیل در تثبیت دی اکسید کربن را جهت جلوگیری از کاهش تثبیت دی اکسید کربن مورد استفاده قرار می دهد (Jianmin *et al.*, 2012).

اثر سطوح مختلف کروم بر میزان تعرق، هدایت روزنه ای و کارایی لحظه ای مصرف آب

کروم اثر معنی داری بر میزان تعرق در گیاهان ایجاد نمود (جدول ۴). در گیاهان با غلظت ۲۵ پی پی ام، میزان تعرق نسبت به گیاهان شاهد افزایش معنی داری یافت ($P < 0/05$) (جدول ۶). میزان تعرق با افزایش غلظت کروم از سطح ۲۵ پی پی ام تا سطح ۱۰۰ پی پی ام در خاک روند کاهشی نشان داد و در غلظت ۱۰۰ پی پی ام کروم، کمترین میزان تعرق مشاهده شد ($P < 0/05$) (جدول ۶). سطوح ۲۵ و ۵۰ پی پی ام کروم میزان تعرق بالاتری نسبت به گیاهان شاهد نشان دادند، در حالیکه میزان تعرق در سطوح ۷۵ پی پی ام و ۱۰۰ کمتر از گیاهان شاهد بود (جدول ۶).

در بررسی حاضر مشخص شد که اعمال تنش کروم با اثرات تخریبی خود بر ساختار سلول های گیاهی بویژه سلول های نگهبان روزنه، سبب افزایش میزان تعرق و هدایت روزنه ای شده است ولی با ادامه روند افزایشی در میزان کروم گیاه توانسته است با فعال سازی مکانیسم های دفاعی و ترمیمی اثرات تخریبی تنش را کاهش دهد و از اتلاف آب جلوگیری نماید. از این رو در غلظت های بالا (۷۵ و ۱۰۰) کاهش میزان تعرق و هدایت روزنه ای در گیاهان تحت تنش نسبت به گیاهان شاهد مشاهده شد که می تواند یک پاسخ دفاعی به تنش محسوب گردد. با افزایش غلظت کروم در خاک، هدایت روزنه ای در گیاهان مورد بررسی به طور معنی داری کاهش یافت ($P < 0/05$) (جدول ۴). این روند کاهشی میزان هدایت روزنه ای نسبت به گیاهان شاهد تا سطح ۱۰۰ پی پی ام ادامه یافت. با این حال میزان هدایت روزنه ای در غلظت ۱۰۰ پی پی ام نسبت به غلظت ۷۵ پی پی ام افزایش معنی داری نشان داد ($P < 0/05$) (جدول ۶).

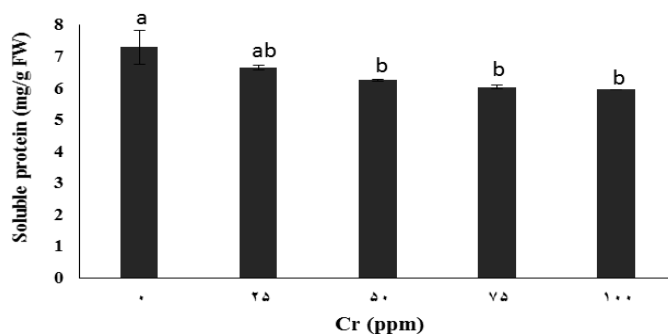
با افزایش غلظت کروم در سطح ۷۵ و ۱۰۰ پی پی ام، کارایی لحظه ای مصرف آب نیز روند افزایشی نشان داد به طوریکه در بیشترین غلظت کروم (۱۰۰ پی پی ام) بیشترین میزان کارایی لحظه ای مصرف آب نیز مشاهده گردید ($P < 0/05$) (جدول ۶). کارایی مصرف آب در گیاهان تحت تیمار با غلظت ۲۵ و ۵۰ پی پی ام کروم به طور معنی داری کمتر از گیاهان شاهد بود ولی با این دو یکدیگر تفاوت معنی داری نداشتند (جدول ۶).

کروم سبب مهار انتقال آب از ریشه به اندام هوایی می گردد. بنابراین تنش کروم با روابط آبی گیاه مرتبط می شود. پژمردگی برخی گیاهان در اثر سمیت کروم مشاهده شده است. پتانسیل بالای اکسیداتیو کروم ۶ سبب تخریب غشاء سلول های نگهبان روزنه می گردد و از این طریق سبب کاهش نرخ تعرق و افزایش هدایت روزنه ای و هدر رفتن آب موجود در گیاه می گردد (Arun *et al.*, 2005) در صورت متحمل بودن گیاه به فلزات سنگین، گیاه می تواند با اعمال مکانیسم های دفاعی از تخریب غشا سلولهای نگهبان جلوگیری نموده و یا از طریق کاهش هدایت روزنه ای و کاهش تعرق در هدر رفتن آب کنترل بیشتری اعمال

نماید. علاوه براین، با افزایش میزان کروم در خاک، میزان تثبیت دی اکسید کربن روند افزایشی نشان داد و از طرفی در غلظت های بالای کروم (۲۵ و ۵۰)، گیاه توانست میزان تعرق و هدایت روزنه ای را به طور مناسبی کاهش دهد تا کارایی لحظه ای مصرف آب را تنظیم نموده و اثرات ثانویه ناشی از تنش کروم را تا حدودی جبران نماید (Castro *et al.*, 2007). کاهش هدایت روزنه ای میزان دسترسی سلول های فتوسنتز کننده را به دی اکسید کربن، به عنوان فاکتورهای اصلی فتوسنتز کاهش می دهد که برآیند آن عدم تامین متابولیت های مورد نیاز برای رشد و نمو سلول های گیاهی است (Saremi Rad *et al.*, 2014). در نهایت می توان چنین بیان نمود که گیاه در شرایط تنش جهت جلوگیری از خروج آب از طریق برگ، با وجود آسیب به غشاء سلولی، اقدام به کاهش تبخیر و تعرق از طریق کوتیکول می کند (Karmollachaab *et al.*, 2013).

اثر سطوح مختلف کروم بر میزان پروتئین محلول

آنالیز واریانس داده ها نشان داد که تیمار کروم باعث تغییر معنی داری ($P < 0/05$) در میزان پروتئین محلول نسبت به شاهد شده است، به طوری که با افزایش میزان کروم از سطح شاهد به سطح ۵۰ پی پی ام، مقدار پروتئین محلول در اندام هوایی گیاهان خرفه به طور معنی داری کاهش یافت (شکل ۵ و جدول ۴) ولی بین میزان پروتئین در سطوح مختلف کروم تفاوت معنی داری مشاهده نشد و با افزایش میزان کروم روند کاهشی بسیار آهسته در میزان پروتئین قابل مشاهده بود (شکل ۵). بنابر این نتایج به نظر می رسد گیاه خرفه توانسته است با استفاده از مکانیسم های تحمل به تنش از قبیل افزایش میزان پروتئین های آنزیمی از قبیل آنزیم های آنتی اکسیدان و افزایش اسمولیت ها در سلول های گیاهی، از کاهش شدید میزان پروتئین در شرایط تنش کروم جلوگیری نماید و از این طریق اثرات تخریبی ناشی از تنش کروم را به حداقل برساند. مطابق با نتایج این بررسی، John و همکاران (۲۰۰۹) بیان کردند که میزان پروتئین های محلول در گیاه *Brassica juncea* L. تیمار شده با غلظت ۹۰۰ میلی مولار کادمیوم کاهش یافتند. در پژوهش انجام شده توسط Bhardwaj و همکاران (۲۰۰۹)، محتوای پروتئین های محلول با غلظت فلز سنگین سرب و کادمیوم به طور معنی داری کاهش یافت. گزارش شده است که کاهش در محتوای پروتئینی در غلظت های بالای فلز کروم می تواند به علت کاهش در سنتز بعضی پروتئین ها و یا احتمالاً افزایش فعالیت آنزیم های پروتئولیتیک باشد (Pirooz *et al.*, 2012). هم چنین، کاهش در محتوای پروتئین گیاهان تحت تیمار با غلظت های بالای کروم می تواند مربوط به تاثیر ROS باشد که ROS باعث تجزیه و نابودی شمار زیادی از پروتئین های گیاه می شود (Sundarmoorthy *et al.*, 2015).



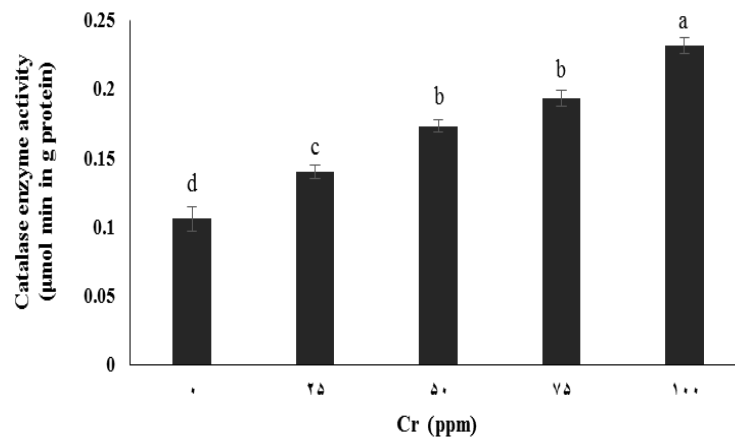
شکل ۵: اثر سطوح مختلف کروم بر میانگین میزان پروتئین محلول در اندام هوایی خرفه

ستون هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند مطابق آزمون LSD اختلاف معنی داری ندارند ($P < 0.05$)

اثر سطوح مختلف کروم بر میزان آنزیم های آنتی اکسیدان

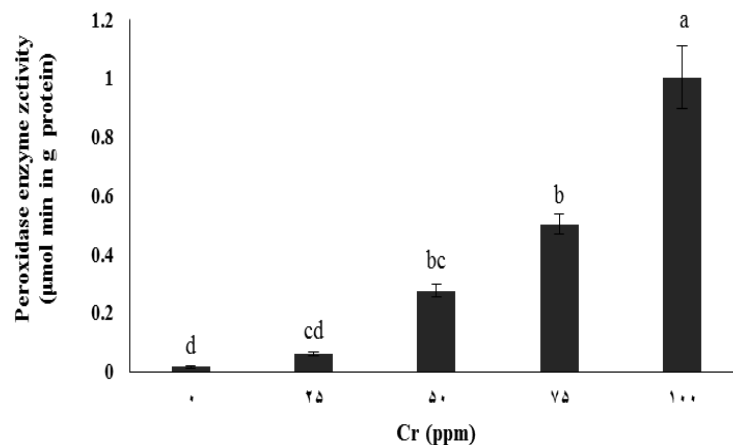
نتایج داده ها نشان داد که کروم تاثیر معنی داری ($P < 0.01$) بر فعالیت آنزیم پراکسیداز و آنزیم کاتالاز در مقایسه با شاهد داشت (جدول ۴). فعالیت آنزیم پراکسیداز و کاتالاز به طور معنی دار ($P < 0.01$) هم راستا با افزایش غلظت کروم زیاد شد (شکل ۶ و ۷). به طوری که در غلظت ۱۰۰ پی پی ام کروم نسبت به نمونه شاهد فعالیت آنزیم پراکسیداز و کاتالاز به ترتیب حدود ۵۷ و ۲ برابر شد (شکل ۶ و ۷). مطابق با نتایج این تحقیق، فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان با افزایش غلظت کروم در گیاه سویا نیز زیاد شد. (Sundarmoorthy *et al.*, 2015). هم چنین، Malar و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که فعالیت آنزیم های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز در بافت های برگ و ریشه گیاه *Eichhornia crassipes* تحت تیمار با سرب افزایش یافت. ارزیابی فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان، به عنوان یک شاخص برای صدمات اکسیداتیو در نظر گرفته می شود. روند تغییر فعالیت هر یک از این آنزیم ها با نوع عنصر ایجادکننده تنش، غلظت عنصر در محیط کشت، آنزیم مورد آزمایش، رقم و اندام گیاهی مورد مطالعه متفاوت است (Wang *et al.*, 2010). بر طبق گزارش Sundarmoorthy و همکاران (۲۰۱۵)، افزایش فعالیت پراکسیداز نشان دهنده قرار گرفتن گیاهان تحت تنش می باشد. پراکسیداز یک آنزیم عمومی برای حذف ROS در گیاه تحت تنش است. (Malar *et al.*, 2016). H_2O_2 به وسیله آنزیم کاتالاز جاروب شده و به آب و O_2 تبدیل می شود (Pandey *et al.*, 2005). هر چند آنزیم پراکسیداز تمایل بیش تری به H_2O_2 نسبت به کاتالاز دارند (Malar *et al.*, 2016). تنش اکسیداتیو به عنوان یک تنش ثانویه در پی تنش کروم برای گیاه اتفاق می افتد. به طوری که، از طریق انتقال الکترون های اضافی در مسیر نوری فتوسنتز به اکسیژن مولکولی در گیاهان تحت تنش کروم میزان گونه های اکسیژن فعال افزایش می یابد (Liu *et al.*, 2008).

Shamsu *et al.*, 2012) هم چنین Zare و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند که افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی در نتیجه اثر مهاری Cr^{3+} بر زنجیره انتقال الکترون در میتوکندری های سلول های گیاهی می باشد. در پژوهش حاضر، احتمالاً به دلیل قدرت اکسید کنندگی بالای کروم شش ظرفیتی، میزان ROS در سلول افزایش یافته و به دنبال آن فعالیت آنزیم های پراکسیداز و کاتالاز برای حذف تنش اکسیداتیو نیز زیاد شده است، که نقش مهمی در حفاظت گیاه در مقابل تنش اکسیداتیو دارد.



شکل ۶: اثر سطوح مختلف کروم بر فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD) در برگ خرفه

ستون هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند مطابق آزمون LSD اختلاف معنی داری ندارند ($P < 0.05$)



شکل ۷: اثر سطوح مختلف کروم بر فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) در برگ خرفه

ستون هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند مطابق آزمون LSD اختلاف معنی داری ندارند ($P < 0.05$)

نتیجه گیری کلی

بنابر نتایج حاصل از این پژوهش مشخص گردید که هم راستا با افزایش غلظت های کروم، به دلیل تولید اکسیژن های واکنشگر و ایجاد تنش اکسیداتیو میزان رشد، کلروفیل a، کاروتنوئید، هدایت روزنه ای و تعرق کاهش یافت، در صورتی که میزان تثبیت دی اکسید کربن، کارایی مصرف آب، رشد، ضریب ثبات کلروفیل و میزان کلروفیل b و کل در غلظت ۱۰۰ پی پی ام به طور معنی داری بیشتر از غلظت ۷۵ پی پی ام بود. در نتیجه، گیاه خرفه با فعال نمودن مکانیسم های دفاعی از قبیل افزایش میزان پروتئین و افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان (کاتالاز و پراکسیداز) و ترکیبات مهار کننده گونه های اکسیژن فعال نه تنها اثرات تخریبی ناشی از تنش کروم را به حداقل ممکن کاهش داده بلکه توانسته است تا حدودی کارایی مصرف آب و میزان تثبیت دی اکسید کربن در سطحی مناسب حفظ نماید و از کاهش شدید آنها جلوگیری نماید، علاوه براین، از این طریق سطح کلروفیل را نیز در حد مطلوبی حفظ نموده و کاهش رشد ناشی از تنش کروم را نیز تا حدودی برطرف نموده است. بنابراین، گیاه خرفه می تواند کاندیدای مناسبی جهت پالایش خاک های آلوده به کروم معرفی گردد. هم چنین، با توجه به خواص دارویی خرفه و تجمع فلزات سنگین در ریشه گیاه (Azizi *et al.*, 2016)، استفاده از اندام هوایی آن جهت مصارف دارویی کاربرد خواهد داشت و تا حدودی کشت این گیاه را توجیه خواهد نمود.

منابع

- Ahmad, S., Nawata, E., Hosokawa, M., Domae, Y. and Sakuratani, T. (2002) Alterations in photosynthesis and some antioxidant enzymatic activities of mungbean subjected to water logging. *Plant Science*. 63(1): 117-123.
- Ahmadi, A. and Sio-Se Mardeh, A. (2004) The Effects of Water Stress on Soluble Carbohydrates, Chlorophyll and Proline Contents of four Iranian Wheat Cultivars under Different Moisture Regimes. *Iranian Journal of Agriculture Science*. 35(3): 753-763. (in Persian)
- Aldoobie, N.F. and Beltagi, M.S. (2013) Physiological, biochemical and molecular responses of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants to heavy metals stress. *African Journal of Biotechnology*. 12(29): 4614-4622.
- Alyazouri, A.H., Jewsbury, R.A., Tayim, H.A., Humphreys, P.N. and Al-Sayah, M.H. (2013) Phytoextraction of Cr (VI) from soil using *Portulaca oleracea*. *Toxicological and Environmental Chemistry*. 95(8): 1338-1347.
- Arun, K.S., Cervantes, C., Herminia, L.T. and Avudainayagam, S. (2005) Chromium toxicity in plants. *Environment International*. 31: 739-753.
- Azizi, E., Rahbarian, R. and Mirbolook, A. (2016) Phytoremediation of Cr+6 in Contaminated Soil Using *Portulaca oleracea*. *Iranian Journal of Soil Research*. 30(2): 161-172. (in Persian)
- Azmat, R., Qureshi, S., Akhtar, Y. and Ahmed, T. (2010) Treatment of Cr+3 contaminated soil by solid tea wastage; a study of physiological processes of *Vigna radiata*. *Pakistan Journal of Botany*. 42(2): 1129-1136.
- Barceló, J. and Poschenrieder, C. (2004) Structural and ultrastructural changes in heavy metal exposed plants. *Heavy metal stress in plants*. Springer, Berlin Heidelberg 2248 Pp.

- Behdani, M.A., Sayyari-Zaha, M.H., Alahrasani, A. and Nakhaei, A.R. (2014) The comparison of micro elements (Mn, Fe and Zn) and heavy metals (Co, Cr and Cd) in the soil of perennial farms of saffron (*Crocus sativus* L.) in southern Khorasan Province. *Agroecology journal*. 6(4): 891-904. (in Persian)
- Bhardwaj, P., Chaturvedi, A.K. and Prasad, P. (2009) Effect of enhanced lead and cadmium in soil on physiological and biochemical attributes of *Phaseolus vulgaris*. L. *Nature and Science*. 7(8): 63-75.
- Bremner, J.M. and Mulvaney, C.S. (1982) Nitrogen total. In: Page, A.L., Miller, R.H. and Keeny, D.R. (Eds), *Method of soil analysis*. American Society of Agronomy Madison. 575-624 Pp.
- Chandlee, J.M. and Scandalios, J.G. (1984) Analysis of variants affecting the catalase development program in *Maize scutellum*. *Theoretical and Applied Genetics*. 69: 71-77.
- Castro, R.O., Trujillo, M.M., Bucio, J.L., Cervantes, C. and Dubrovsky, J. (2007) Effects of dichromate on growth and root system architecture of *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Science*. 172: 684-691.
- Davies, F.T., Puryear, J.D., Newton, R.J., Egilla, J.N. and Grossi, J.A.S. (2002) Mycorrhizal fungi increase chromium uptake by sunflower plants: Influence on tissue mineral concentration, growth, and gas exchange. *Journal of Plant Nutrition*. 25(11): 2389-2407.
- Dias, C.M., Monteiro, C., Moutinho-Pereira, J., Correia, C., Goncalves, B. and Santos, C. (2013) Cadmium toxicity affects photosynthesis and plant growth at different levels. *Acta Physiologiae Plantarum*. 35: 1281-1289.
- Dogo, S., Razic, S., Manojlovic, D. and Slavkovic, L. (2011) Analysis of the bioavailability of Cr (III) and Cr (VI) based on the determination of chromium in *Mentha piperita* by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Journal of the Serbian Chemical Society*. 76(1): 143-153.
- Liu, D., Zou, J., Wang, M. and Jiang, W. (2008) Hexavalent chromium uptake and its effects on mineral uptake, antioxidant defence system and photosynthesis in *Amaranthus viridis* L.. *Bioresource Technology*. 99(7): 2628-2636.
- Gonzalez, A., Gil-Díaz, M. and Lobo, M.C. (2015). Response of two barley cultivars to increasing concentrations of cadmium or chromium in Soil during the growing period. *Biological Trace Element Research*. 163(1-2): 235-243.
- Holy, M.C. (1972). Indole acetic acid oxidase: a dual catalytic enzyme. *Plant Physiology*. 50: 15-18.
- Hussein, A., Mohammed, A.H. and Walaa, E. (2014). Comparative effects of purslane seed oil (PSO) and 5-lourourasil on Ehrlich ascites carcinoma (EAC) in female albino mice. *International Journal of Pharma Science*. 4(1): 424-430.
- Inbar, Y., Hadar, Y. and Chen, Y. (1993) Recycling of cattle manure: The composting process and characterization of maturity. *Journal of Environmental Quality*. 22(59): 857-863.
- James, B.R. and Petura, J.C. (1995) Hexavalent Chromium extraction from soils acomparison of 5 methods. *Environmental Science and Technology*. 29(9): 2377-2381.
- John, R., Ahmad, P., Gadgil, K. and Sharma, S. (2009) Heavy metal toxicity: Effect on plant growth, biochemical parameters and metal accumulation by *Brassica juncea* L. *International Journal of Plant Production*. (3): 65-76.
- Jianmin, T., Jingyi, X., Yongsheng, W., Yansheng, L. and Qian, T. (2012) Effects of high concentration of chromium stress on physiological and biochemical characters and accumulation of chromium in tea plant (*Camellia sinensis* L.). *African Journal of Biotechnology*. 11(9): 2248-2255.

- Karmollachaab, A., Gharineg, M.H., Bakhshandeh, A., Moradi Telvat, M. and Fathi, G. (2013) Effect of silicon application on physiological characteristics and growth of wheat (*Triticum aestivum* L.) under drought stress condition. *Agroecology*. 5(4): 430-442. (in Persian)
- Khavarinejad, R.A., Najafi, F. and Aslani, F. (2016) The effect of different concentrations of potassium dichromate on some antioxidants contents and growth in *Zea mays* L., *Journal of Plant Researchs*. 28(2): 285-296. (in Persian)
- Kim, I.S., Kang, K.H., Jonson-Green, P. and Lee, E.J. (2003) Investigation of Heavy Metal Accumulation in *Polygonum thunbergii* for Phytoextraction. *Environmental Pollution*. 126: 235-243.
- Klute, A., and Dinauer, R. C. (1986) *Physical and mineralogical methods*. Planning. 8: 79.
- Lichtenthaler, H.K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic membrane. *Method Enzymology*. 148: 350-382.
- Lodeiro, P., Fuentes, A., Herrero, R. and Sastre de Vicente, M.E. (2008) Cr (III) binding by surface polymers in natural biomass: the role of carboxylic groups. *Environmental Chemistry*. 5: 355-36.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193(1): 265-275.
- Malar, S. Vikram, S.S., Favas, P.J. and Perumal, V. (2016) Lead heavy metal toxicity induced changes on growth and antioxidative enzymes level in water hyacinths [*Eichhornia crassipes* (Mart.)]. *Botanical studies*. 55(1): 1-11.
- Maxwell, K. and Johnson, G.N. (2000) Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of Experimental Botany*. 51: 659-668.
- Mishra, S., Srivastava, S. and Tripathi, P.D. (2006) Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. *Plant Physiology and Biochemistry*. 44: 25-37.
- Molassiotis, A., Satipoulos, T., Tanou, G., Diamantidis, G. and Therios, I. (2005) Boron –induced oxidative damage and antioxidant and uncoupled responses in shoot tips culture of apple rootstock EM9 (*Malus domestica* Borkh.). *Environmental and Experimental Botany*. 56: 54-62.
- Mubashir, H., Masoodi Bahar, A., Showkat, R.M., Bila, A.Z. and Nahida, T. (2011) *Portulaca oleracea* L. A Review. *Journal of Pharmacy Research*. 4(9): 3044-3048.
- Olsen, S.R., Cole, C.V., Watanabe, F.S. and Dean, L.A. (1954) Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. United States Department of Agriculture; Washington. 939-992 Pp.
- Olutoyosi, A., Ndakidemi, P., Snyman, R. and Odendaal, J. (2012) Assessment of metal concentrations, chlorophyll content and photosynthesis in *Phragmites australis* along the Lower Diep river, CapeTown, south Africa. *Energy and Environmental Science*. 2(1): 128-139.
- Orhue, E. R. and Uzu, F.O. (2011) Residual Effect of Chromium on Early Growth of Fluted Pumpkin (*Telfairia occidentalis* Hook F) in an Ultisol. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*. 15(3): 493-500.
- Panda, S.K. (2007) Chromium-mediated oxidative stress and ultrastructural changes in root cells of developing rice seedlings. *Journal of Plant Physiology*. 164: 1419-1428.
- Pandey, V., Dixit, V. and Shyam, R. (2005) Antioxidative responses in relation to growth of mustard (*Brassica juncea* cv. Pusa Jaikisan) plants exposed to hexavalent chromium. *Chemosphere*. 61: 40-47.

- Pirooz, P.S., Manochehri Kalantari, K.M. and Nasibi, F. (2012) A physiological analysis of sunflower under chromium stress: Impact on plant growth, bioaccumulation and oxidative stress induction on sunflower (*Helianthus annuus*). Iranian journal of Plant Biology. 4(11). 73-86. (in Persian)
- Rahbarian, R., Khavari nejad, R., Ganjeali, A., Bagheri, A. and Najafi, F. (2011) Drought stress effect on photosynthesis, chlorophyll fluorescence and water relations in tolerant and susceptible Chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes. Acta Biologica Cracoviensia series Botanica. 53(1): 47-56.
- Redondo-Gomez, S., Mateos-Naranjo, E., Vecino-Bueno, I. and Feldman, S.R. (2011) Accumulation and tolerance characteristics of chromium in a cordgrass Cr-hyperaccumulator *Spartina argentinensis*. Journal of Hazardous Materials. 185: 862-869.
- Rehana, H., Javid, A., Parray, A., Kamili, N. and Mahmood, U. (2012) Chromium stress in Brassica juncea L. cv. Pusa Jai Kissan under hydroponic culture. African Journal of Biotechnology. 11(90): 15658-15663.
- Sairam, R.K., Deshmukh, P.S. and Shukla, D.S. (1997) Tolerance of drought and temperature stress in relation to increased antioxidant enzyme activity in wheat. Journal of Agronomy and Crop Science. 178: 171-178.
- Sanita, L., Fossati, F., Musettim, R., Mikerezi, I. and Favali, M.A. (2002) Chromium on maize and cauliflower plants. Journal of Plant Nutrition. 25(4):701-717.
- Saremi Rad, B., Esfandiari, E.A., Shokrpour, M., Sofalian, O., Avanes, A. and Mousavi, S.B. (2014) Cadmium effects on some morphological and physiological parameters in wheat at seedling stage. Journal of Plant Research. 27(1): 1-11.
- Shamsu, H., Gulshan, K., Mohammad, I., Arif, S.H., Bhumi, N. and Aqil, A. (2012) Physiological changes induced by chromium stress in plants: an overview. Protoplasma. 249: 599-611.
- Shanker, A.K., Cervantes, C., Loza-Tavewra, H. and Avudainayagam, S. (2005) Chromium Toxicity in Plants. Environment International. 31: 739-753.
- Shanker, A.K. and Pathmanabhan, G. (2004) Speciation dependant antioxidative response in roots and leaves of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench cv CO 27) under Cr (III) and Cr(VI) stress. Plant and Soil. 265: 141-151.
- Sharma, D.C., Sharma, C.P. and Tripathi, R.D. (2003) Phytotoxic lesions of chromium in maize. Chemosphere. 51(1):63-68.
- Simard, R.R. (1993) Ammonium acetate extractable elements. In: Martin, R. and Carter, S. (Eds), Soil sampling and method of analysis. Lewis publisher. Florida, USA. pp. 39-43.
- Subrahmanyam, D. (2008) Effects of chromium toxicity on leaf photosynthetic characteristics and oxidative changes in wheat (*Triticum aestivum* L.). Photosynthetica. 46(3): 339-345.
- Sundarmoorthy, P., Sankarganesh, K., Selvaraj, M., Baskaran, L. and Chidambaram, A.A. (2015) Chromium induced changes in soybean (*Glycine max* L.) metabolism. World Scientific News. (10):145-178.
- Uddin, M.K., Juraimi, A.S., Ali, M.E. and Ismail, M.R. (2012) Evaluation of antioxidant properties and mineral composition of purslane (*Portulaca oleracea* L.) at different growth stages. International Journal of Molecular Science. 13: 10257-10267.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency). (1996) Alkaline Digestion for Hexavalent Chromium. Method 3060A. Washington, DC: USEPA.

- Vajpayee, P., Tripathi, R.D., Rai, U.N., Ali, M.B. and Singh, S.N. (2000) Chromium (VI) accumulation reduces chlorophyll biosynthesis, nitrate reductase activity and protein content in *Nymphaea alba* L. *Chemosphere*. 41:1075-1082.
- Wang, S., He, X. and An, R. (2010) Responses of growth and antioxidant metabolism to nickel toxicity in *Luffa cylindrica* seedlings. *Journal of Animal and Plant Sciences*. 7(2): 810-821.
- Zare, M., Siroosmehr, A. and Abdkhani, S. (2015) Effects of mycorrhizal fungi on morphological and physiological parameters of Sorghum (*Sorghum bicolor* L.) under Chrome stress. 2(9): 15-169. (in Persian)
- Zarafshar, M., Akbarinia, M., Asgari, H., Hosaini, S.M. and Rahae, M. (2015) Physiological and Biochemical properties of wild pear seedlings (*Pyrus biosseriana*) in response to different watering regimes, *Journal of Applied Biology*. 28(1): 59-78. (in Persian)
- Zou, J.H., Wang, M., Jiang, W.S. and Liu, D.H. (2006) Chromium accumulation and its effects on other mineral elements in *Amaranthus viridis* L. *Acta Biologica Cracoviensia series Botanica*. 48(1): 7-12.
- Zou, J., Yu, K., Zhang, Z., Jiang, W. and Liu, D. (2009) Antioxidant response system and chlorophyll fluorescence in chromium (VI)-treated *Zea mays* L. seedlings. *Acta Biologica Cracoviensia series Botanica*. 51(1): 23-33.

Evaluation of Cr stress tolerance in *Portulaca oleracea* L. based on growth, photosynthesis indexes and the activity of antioxidant enzymes

R.Rahbarian^{1*}, E. Azizi², A. Behdad^{1,3}, A. Mirblook^{2,4}

Received: 2016.4.10

Accepted: 2018.4.29

Abstract

In order to investigate effects of Cr stress on growth, photosynthetic indexes and the activity of antioxidant enzymes in *Portulaca oleracea* L. (Purslane), an experiment in the greenhouse of Ferdowsi University of Mashhad, was done in a completely randomized design with three replications of five levels (0, 25, 50, 75 and 100 ppm). The amount of Cr⁺⁶ in the soil, root and shoot at different levels of stress were measured. By increasing the chromium content in shoot and root were significantly increased. Chromium accumulation at root was more than shoot. Stomatal conductance, chlorophyll a, carotenoids, transpiration and efficiency of photosystem II decreased with increasing the amount of Cr. However, the CO₂ assimilation, water use efficiency, growth, coefficient stability index (CSI) and chlorophyll b and total chlorophyll concentration in 100 ppm was significantly higher than 75 ppm. Also, the activity of catalase and peroxidase increased by increasing the amount of Cr⁺⁶. Based on the results, chromium in low concentrations possibly effected on biosynthesis of photosynthetic pigments and caused disorder of photosynthetic electron transport, decreased photosynthetic efficiency, thereby reduced the production of reactive oxygen species and growth. But at higher levels of chromium (100 ppm), purslane by activating defense mechanisms such as increasing the activity of antioxidant enzymes and prevent a sharp decline in total proteins could reduce somewhat the damage and maintained the water use efficiency. The purslane is likely to be as tolerant plants of chromium and it was effective in refining the contaminated soils with this heavy metal.

Keywords: peroxidase, photosystem II efficiency, chlorophyll, heavy metal

1-Department of biology, Faculty of science, Payame Noor University, Tehran, Iran

2- Department of agronomy, Faculty of agriculture, Payame Noor University, Tehran, Iran

*(Corresponding Author: Ra_rahbarian@yahoo.com)

3- Ph D student in plant physiology, Shiraz University, Shiraz, Iran

4- Ph D student in soil chemistry, Urmia University, Urmia, Iran

*(Corresponding Author: Ra_rahbarian@yahoo.com)