زیست‌شناسی گیاهی، سال چهارم، شماره سیزدهم، پاییز ۱۳۹۱، صفحه ۹۷-۱۱۴
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۰۹/۰۵
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۰/۱۲/۰۳
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۰/۱۲/۲۲

تأثیر فلز سنگین کروم بر میزان تجمع، عوامل رشد و القا تنش اکسیداتیو در اندام هوایی گیاه آفتابگردان (*Helianthus annuus*)

پریا سادات پیروز و خسرو منوچهری کلانتری *
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر، کرمان، ایران

چکیده

کروم به عنوان هفتمین عنصر فراوان در پوسته زمین، در غلظت‌های پایین، رشد گیاهان را افزایش می‌دهد. در حالی که غلظت‌های بالای کروم به عنوان عاملی تنش‌زا برای گیاهان به شمار رفته، می‌تواند به عنوان یک عامل محدودکننده رشد، ویژگی‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاهان را تحت تأثیر قرار دهد. هدف از این تحقیق، بررسی اثر غلظت‌های متفاوت کروم بر برخی از شاخص‌های رشد و همچنین القا تنش اکسیداتیو در گیاه آفتابگردان (*Heliantus annuus*) است. تیمار گیاهان پس از گذشت ۴ هفته از کشت در شرایط گلخانه، با محلول کلرید کروم در غلظت‌های صفر، ۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار همراه با محلول غذایی انجام شد. پس از ۳ هفته تیمار، گیاهان برای انجام آزمایش‌های فیزیولوژیک و بیوشمیایی برداشت شدند. نتایج نشان داد که غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌مولار کروم در محلول غذایی باعث کاهش شاخص‌های رشد اندام هوایی شد، اما غلظت‌های پایین‌تر از آن، اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه شاهد نداشت. پراکسیداسیون لیپیدها در غلظت‌های ۱، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار کروم به طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد افزایش یافت و این بیانگر ایجاد تنش اکسیداتیو ناشی از غلظت‌های به کار رفته کروم در گیاه مورد آزمایش بوده است. محتوای پرولین اندام هوایی با افزایش غلظت کروم در محلول‌های تیمار افزایش یافت، در حالی که میزان پروتئین کاهش نشان داد. محتوای آسکوربیک اسید احیا شده برگ گیاهان تحت تیمار با کروم با افزایش غلظت کروم کاهش نشان داد، در حالی که میزان دهیدروآسکوربیک اسید و آسکوربیک اسید کل افزایش یافت. بنابراین، به نظر می‌رسد آسکوربیک اسید به عنوان یک مکانیسم دفاعی غیر آنزیمی، نقشی کلیدی در ایجاد مقاومت آفتابگردان در برابر تنش اکسیداتیو القا شده توسط فلز سنگین کروم ایفا می‌کند. بررسی میزان تجمع کروم در اندام هوایی آفتابگردان نیز نشان داد که میزان تجمع در بذرهای آفتابگردان با افزایش معنی‌دار برای غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌مولار همراه است. این مورد می‌تواند به عنوان هشداری سودمند، در استفاده کنترل شده از گیاهان خوراکی رشد یافته در خاک‌های آلوده به فلزات سنگین از جمله کروم در نظر گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: آسکوربیک اسید، آفتابگردان (*Heliantus annuus*)، پرولین، پروتئین کل، تجمع فلز، تنش اکسیداتیو، فلز کروم، شاخص‌های رشد

*نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: kalantari@mail.uk.ac.ir، شماره تماس: ۰۳۴۱۳۲۲۲۰۳۲

مقدمه

کروم هفتمین عنصر فراوان بر روی کره زمین (Panda and Choudhury, 2005) و از جمله عناصر واسطه جدول تناوبی است که در دهه اخیر به عنوان یکی از مهم‌ترین آلاینده‌های محیطی محسوب می‌شود. طبق تعریف فلزات سنگین (Prasad and Strzatka, 2002)، کروم با داشتن چگالی مخصوص ۷/۲ در دسته فلزات سنگین جای گرفته، در غلظت‌های بالا با سمیّتی که ایجاد می‌کند، می‌تواند باعث صدمه زدن به سیستم‌های زیستی شود. در حال حاضر، کروم به علت استفاده‌های وسیع صنعتی به طور گسترده‌ای در خاک رها می‌شود (Sankar Ganesh, *et al*., 2008). صنایع چرم‌سازی و دباغی، استیل‌سازی، کاشی‌سازی و ... با رهاسازی پساب‌های صنعتی به آب‌های جاری، بیشترین سهم در آلودگی با کروم را به عهده دارند (Sundaramoorthy *et al*., 2010). در دهه گذشته به علت فعالیت‌های انسانی، مقدار کروم در اکوسیستم‌های آبی و خاکی افزایش یافته است (Barbosa *et al*., 2007). در این میان، معادن کرومیت نیز در میان منابع مختلف کروم در طبیعت قابل توجه هستند. معدن کرومیت نزدیک شهرستان بافت از شهرهای استان کرمان قرار دارد. پوشش گیاهی منطقه بافت از لحاظ مقاومت و تحمل نسبت به فلز کروم یکی از چشم‌اندازهای این پژوهش بوده است.

در طبیعت کروم به دو شکل متفاوت اکسید شده وجود دارد: کروم با ظرفیت III و کروم با ظرفیت VI (Barnhart, 1997). این دو ظرفیت کروم، شکل‌های پایدار کروم را تشکیل می‌دهند. اگر چه ظرفیت‌های متنوع دیگری هم برای کروم وجود دارد، با وجود این، سایر ظرفیت‌ها ناپایدار بوده، در سیستم‌های زنده عمر کوتاهی دارند (Shanker *et al*., 2005). ظرفیت‌های پایدار کروم در میزان تحرک‌پذیری، در دسترس بودن زیستی و سمیّت با هم متفاوتند. کروم VI به عنوان سمّی‌ترین شکل کروم در نظر گرفته می‌شود، از این رو که معمولاً در اکسی آنیون‌های کرومات ($Cr_2O_4^{-2}$) یا دی کرومات ($Cr_2O_7^{-2}$) به اکسیژن پیوسته است. کروم III تحرک و سمیّت کمتری دارد و اساساً به ماده آلی خاک و محیط‌های آبی باند می‌شود (Becquer *et al*., 2003; Lodeiro *et al*., 2008). بسته به حالت اکسیداسیون، کروم می‌تواند برای انسان و حیوانات آثار سودمند یا مضر و سمّی داشته باشد (Zayed *et al*., 1998). کروم III در مقادیر اندک برای انسان و حیوانات عنصری ضروری محسوب می‌شود (Shrivastava *et al*., 2002؛ Panda and Choudhury, 2005). کروم III برای متابولیسم طبیعی کربوهیدرات، لیپید و پروتئین ضروری است. کروم از نظر زیستی به عنوان بخشی از یک اولیگوپپتید به نام کرومودولین، اتصال انسولین به گیرنده‌هایش را در سطح سلول تسهیل می‌کند (Sreejayan *et al*., 2008). همچنین، گزارش‌هایی در دست است که نشان می‌دهد غلظت‌های پایین کروم می‌تواند سبب تحریک رشد گیاهان شود (Bonet *et al*., 1991؛ Han *et al*., 2004؛ Pandey *et al*., 2005). از سوی دیگر، غلظت‌های بالای هر دو ظرفیت کروم می‌تواند باعث ایجاد سمیّت در گیاهان شود.

محدوده سمیّت کروم برای گیاهان زراعی از ۰/۵ تا ۵/۰ میلی‌گرم بر لیتر در محلول غذایی و ۵ تا ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در خاک است (Panda and Choudhury, 2005). گزارش شده است که سمیّت

گیاه توسط کروم می‌تواند باعث کاهش رشد، زردی برگ‌های جوان، کاهش محتوای رنگیزه‌ای، تغییر عملکرد آنزیمی، آسیب به سلول‌های ریشه و تغییرشکل فراساختار کلروپلاست و غشاهای سلولی شود (McGrath, 1985؛ Panda and Patra, 2000؛ Panda *et al.*, 2002؛ Panda and Khan, 2003؛ Hu *et al.*, 2005؛ Shanker *et al.*, 2005؛ Panda and Choudhury, 2005). همچنین، می‌تواند با تولید رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن مانند رادیکال‌های سوپراکسید ($O_2^{\cdot-}$)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و رادیکال‌های هیدروکسیل ($OH^{\cdot}$) باعث القای تنش اکسیداتیو در گیاهان شود (Sinha *et al.*, 2005). گزارش شده است که افزایش میزان پراکسیداسیون لیپیدها که به عنوان شاخصی از تنش اکسیداتیو در نظر گرفته می‌شود، می‌تواند به علت رادیکال های آزاد تولید شده در اثر سمیّت کروم باشد (Dhir *et al.*, 2009).

همان طور که ذکر شد، غلظت‌های بالای هر دو ظرفیت کروم می‌تواند باعث ایجاد سمیّت در سیستم‌های زیستی شود. در این میان، کروم VI با داشتن سمیّت بالا یک عامل سرطان‌زای قوی محسوب می‌شود که در مقادیر بالا می‌تواند به مرگ انسان و حیوانات منجر شود (Nriagu Jerome and Nieboer, 1988). تغذیه از مشتقات گیاهی حاوی کروم از قبیل سبزیجات مختلف، بخش عمده دریافت روزانه کروم برای انسان محسوب می‌شود، لذا، استفاده از گیاهان رویش یافته در محیط‌های آلوده با کروم باید کاملاً تحت بررسی و نظارت کارشناسانه انجام شود (Zayed *et al.*, 1998). در این پژوهش، ضمن بررسی اثر غلظت‌های متفاوت فلز سنگین کروم بر شاخص‌های رشد و القای تنش اکسیداتیو در اندام هوایی گیاه آفتابگردان، تجمع آن در بخش هوایی و بذر، ازنقطه نظر یک گیاه دانه روغنی مهم، بررسی شد.

مواد و روش‌ها

گیاه مورد آزمایش در این پژوهش، آفتابگردان (*Helianthus annuus*) رقم KF84 بود که از مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر تهیه شد. سه عدد بذر سالم و تقریباً یک اندازه آفتابگردان، در گلدان‌هایی به قطر ۱۶ سانتی‌متر حاوی پرلیت اسیدشوی شده، کشت داده شد و در شرایط کنترل شده گلخانه رویش یافت. گلدان‌ها در دو هفته اول تنها با آب، از شروع هفته سوم با کامل شدن برگ‌های لپه‌ای توسط محلول غذایی Long-Ashton (Meidner, 1984) با اسیدیته ۶ تا ۶/۵ و از شروع هفته پنجم به مدت سه هفته با محلول‌های غذایی ۱:۲ رقت حاوی ۶ غلظت کروم III با مقادیر ۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار و یک گروه شاهد (محلول غذایی فاقد کروم) آبیاری شدند. محلول غذایی استفاده شده محلول Long-Ashton (Hewitt, 1952) بود. پس از رشد دانه‌رُست‌ها، تعداد گیاهان هر گلدان به دو گیاه مشابه از لحاظ رشد، کاهش یافت.

مطالعه عوامل رشد

اندازه‌گیری طول اندام هوایی

طول ساقه آفتابگردان با استفاده از خط‌کش میلی‌متری اندازه‌گیری شد. طول ساقه از یقه تا قسمت انتهایی ساقه در نظر گرفته شد. برای هر گروه تیمار ۳ تکرار و هر تکرار از میانگین ۳ نمونه محاسبه و بر اساس واحد سانتی‌متر گزارش شد.

اندازه‌گیری وزن تر (FW) و خشک (DW) اندام هوایی

پس از جدا کردن اندام هوایی و ریشه از یکدیگر، وزن اندام هوایی برحسب گرم با ترازوی Sartorius مدل BPSIID با دقت ۰/۰۰۱ گرم اندازه‌گیری شد. سپس نمونه‌ها در فویل آلومینیومی پیچیده و به مدت ۷۲ ساعت در آون در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد خشک شد تا وزن خشک ثابت شود. سپس وزن خشک نمونه‌ها با دقت ۰/۰۰۱ توزین شد.

تعیین سطح برگ

برای اندازه‌گیری سطح برگ از روش کپی کاغذی استفاده شد.

مطالعات بیوشیمیایی

سنجش میزان کلروفیل و کاروتنوئید

برای سنجش میزان کلروفیل و کاروتنوئید از روش Lichtenthaler (۱۹۸۷) استفاده شد.

سنجش مقدار پراکسیداسیون چربی‌ها

برای سنجش مقدار پراکسیداسیون چربی‌های غشا، غلظت مالون‌دی‌آلدئید (MDA) به روش Heath و Packer (۱۹۶۸) اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری مقدار پرولین

برای اندازه‌گیری غلظت پرولین اندام هوایی گیاه از روش Bates (۱۹۷۳) استفاده شد و با استفاده از رسم منحنی استاندارد میزان این آمینواسید سنجش شد.

سنجش غلظت پروتئین

اندازه‌گیری مقدار پروتئین اندام هوایی گیاه توسط روش Bradford (۱۹۷۶) انجام شد و با استفاده از رسم منحنی استاندارد آلبومین میزان آن سنجش شد.

سنجش مقدار آسکوربیک‌اسید و دی‌هیدروآسکوربیک‌اسید

برای تعیین مقدار آسکوربیک‌اسید و دی هیدروآسکوربیک‌اسید از روش de Pinto و همکاران (۲۰۰۰) استفاده شد. بر اساس این روش، میزان آسکوربیک اسید کل و دی هیدروآسکوربیک اسید با استفاده از رسم منحنی استاندارد سنجش و میزان آسکوربیک‌اسید از تفاضل این دو شاخص محاسبه شد.

تعیین میزان یون کروم در اندام هوایی و بذر آفتابگردان به روش جذب اتمی

برای اندازه‌گیری تجمع یون کروم در اندام هوایی و بذر آفتابگردان، از روش جذب اتمی استفاده شد (برگرفته از: Lozak *et al.*, 2002). پس از مراحل آماده‌سازی نمونه‌ها در نیتریک اسید، اندازه‌گیری یون‌های کروم در اندام هوایی و بذر آفتابگردان انجام شد. از محلول به دست آمده برای اندازه‌گیری در دستگاه جذب اتمی Atomic Absrbtion Spectrometer مدل SpectrAA 220 ساخت کشور آمریکا استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

این تحقیق، در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۱ و آزمون ANOVA انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام شد.

نتایج

نتایج حاصل از اثر فلز کروم بر شاخص‌های رشد آفتابگردان

رشد طولی اندام هوایی

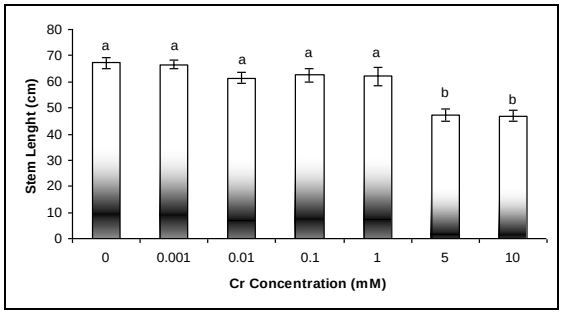
نتایج آنالیز واریانس داده‌های حاصل از اثر ۶ غلظت مختلف کروم بر رشد طولی اندام هوایی گیاه آفتابگردان نشان داد که با افزایش غلظت کروم، رشد طولی اندام هوایی با کاهش معنی‌داری در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌مولار همراه است، در حالی که برای سایر غلظت‌ها تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری در سطح ۵ درصد مشاهده نشد (شکل ۱).

سطح برگ سوم

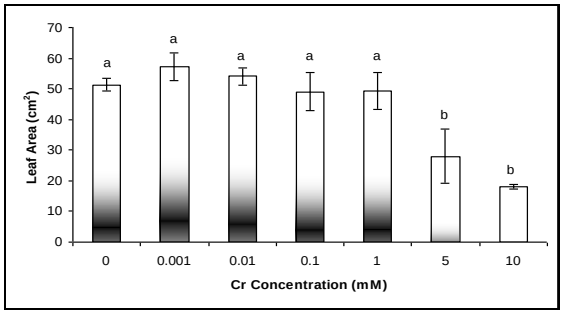
سطح برگ سوم در گیاه آفتابگردان تحت غلظت‌های ۰/۰۰۱ و ۰/۰۱ میلی‌مولار کروم تا حدودی نسبت به گیاهان گروه شاهد افزایش نشان داد، اما این تفاوت از نظر آماری در سطح ۵ درصد معنی‌دار نبود. سطح برگ سوم در گیاهان تحت تیمار، از غلظت ۰/۱ میلی‌مولار کروم به بالا نسبت به گروه شاهد کاهش نشان داد که این کاهش در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌مولار کروم از لحاظ آماری در سطح ۵ درصد معنی‌دار است (شکل ۲).

وزن تر و خشک اندام هوایی

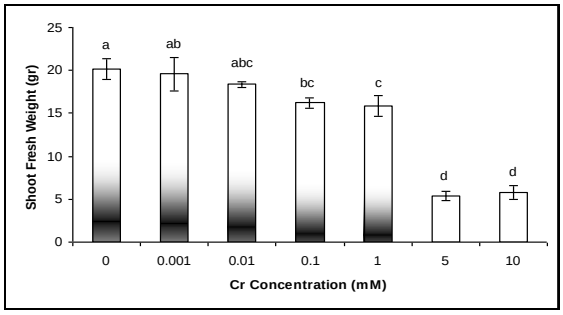
وزن تر اندام هوایی گیاه آفتابگردان تیمار شده با کروم، با افزایش غلظت کروم در محلول‌های تیمار، کاهش نشان داد که این کاهش در غلظت‌های ۰/۱، ۱، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار کروم نسبت به گیاهان گروه شاهد معنی‌دار است. در مورد وزن خشک نیز، با افزایش غلظت کروم در محلول‌های تحت تیمار، وزن خشک اندام هوایی آفتابگردان کاهش نشان داد که این کاهش برای غلظت‌های ۱، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار کروم نسبت به گروه شاهد از لحاظ آماری در سطح ۵ درصد معنی‌داراست (شکل‌های ۳ و ۴).



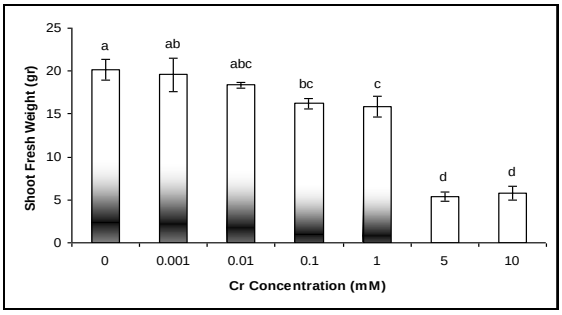
شکل ۱- اثر فلز کروم بر رشد طولی اندام هوایی گیاه آفتابگردان. مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن و در ۵ تکرار انجام شد. حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.



شکل ۲- اثر فلز کروم بر سطح برگ سوم گیاه آفتابگردان. مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن و با ۵ تکرار انجام شد. حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.



شکل ۳- اثر فلز کروم بر وزن تر اندام هوایی گیاه آفتابگردان. مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن و در ۵ تکرار انجام شد. حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.



شکل ۴- اثر فلز کروم بر وزن خشک اندام هوایی گیاه آفتابگردان. مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن و با ۵ تکرار انجام شد. حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.

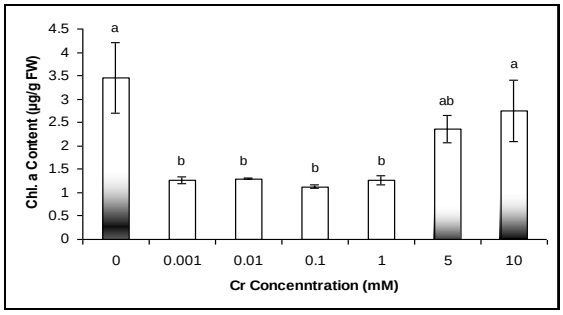
نتایج حاصل از اثر فلز کروم بر شاخص‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک در گیاه آفتابگردان

رنگیزه‌های فتوسنتزی

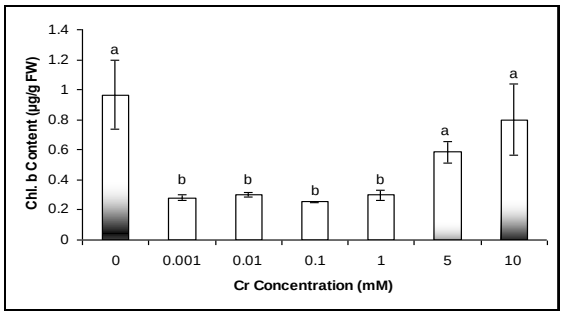
نتایج آنالیز واریانس داده‌های حاصل از اثر تیمار ۶ غلظت فلز سنگین کروم بر محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاه آفتابگردان نشان داد که محتوای کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئیدهای گیاه در غلظت‌های ۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۰/۱ و ۱ نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری داشته است، در حالی که غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌مولار کاهش معنی‌دار نیست (شکل‌های ۵، ۶، ۷ و ۸).

میزان مالون‌دی‌آلدئید اندام هوایی

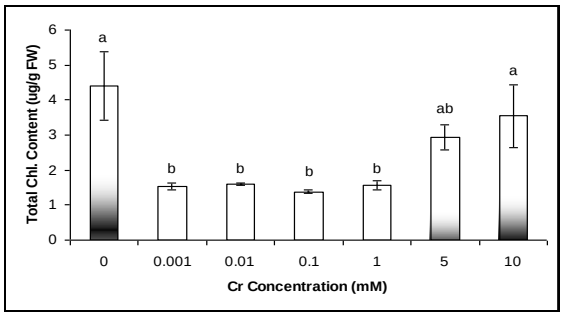
نتایج آنالیز واریانس داده‌های حاصل از تنش فلز سنگین کروم بر مقدار مالون‌دی‌آلدئید اندام هوایی آفتابگردان نشان داد که با افزایش غلظت کروم در محلول‌های تیمار، میزان مالون‌دی‌آلدئید اندام هوایی افزایش یافت و این روند افزایشی از غلظت ۰/۰۱ میلی‌مولار کروم به بالا معنی‌دار بوده است (شکل ۹).



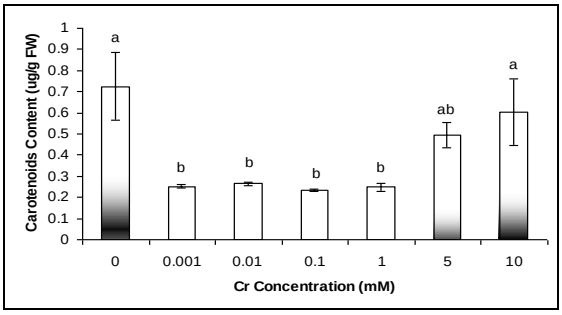
شکل ۵- اثر فلز کروم بر محتوای کلروفیل a در گیاه آفتابگردان. مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن و با ۴ تکرار انجام شد. حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.



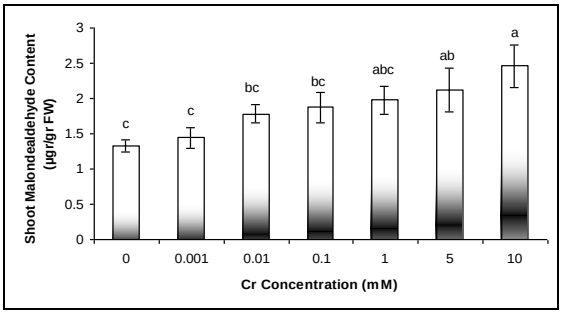
شکل ۶- اثر فلز کروم بر محتوای کلروفیل b در گیاه آفتابگردان. مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن و با ۴ تکرار انجام شد. حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.



شکل ۷- اثر فلز کروم بر محتوای کلروفیل کل در گیاه آفتابگردان. مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن و با ۴ تکرار انجام شد. حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.



شکل ۸- اثر فلز کروم بر محتوای کاروتنوئید در گیاه آفتابگردان. مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن و با ۴ تکرار انجام شد. حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.



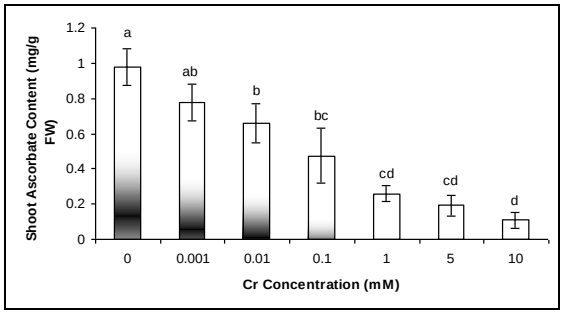
شکل ۹- اثر فلز کروم بر محتوای مالون‌دی‌آلدئید اندام هوایی در گیاه آفتابگردان. مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن و با ۴ تکرار انجام شد. حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.

آسکوربیک اسید، دهیدروآسکوربیک اسید و آسکوربیک اسید کل اندام هوایی

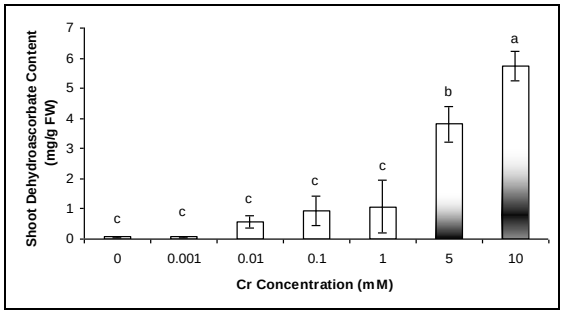
نتایج تغییرات میزان آسکوربیک اسید اندام هوایی گیاه آفتابگردان تحت ۶ تیمار متفاوت کروم نشان داد که مقدار آسکوربیک اسید اندام هوایی آفتابگردان با افزایش غلظت کروم در محلول‌های تیمار کاهش یافته است و این کاهش از غلظت ۰/۰۱ میلی‌مولار کروم به بالا معنی‌دار بود. نتایج نشان داد که میزان دهیدروآسکوربیک اسید اندام هوایی با افزایش غلظت کروم افزایش یافت و این افزایش برای غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌مولار کروم معنی‌دار بود. آسکوربیک اسید کل اندام هوایی نیز در تیمار با غلظت‌های بیشتر از ۰/۰۱ میلی‌مولار کروم روند افزایشی نشان داد و افزایش در تیمار با غلظت‌های بیشتر از ۵ میلی‌مولار معنی‌دار بود (شکل‌های ۱۰، ۱۱ و ۱۲).

پروتئین اندام هوایی

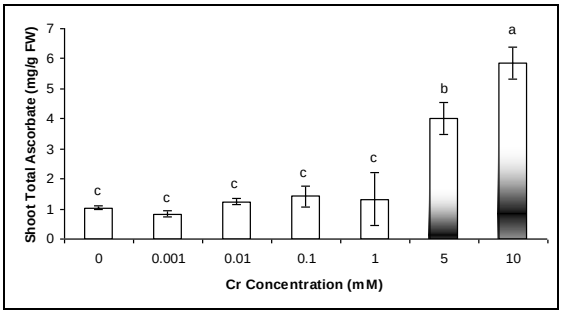
نتایج آنالیز واریانس داده‌های حاصل از اثر ۶ غلظت مختلف کروم بر میزان پروتئین اندام هوایی گیاه آفتابگردان با کاهش معنی‌دار محتوای پروتئین در غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار کروم همراه بود (شکل ۱۳).



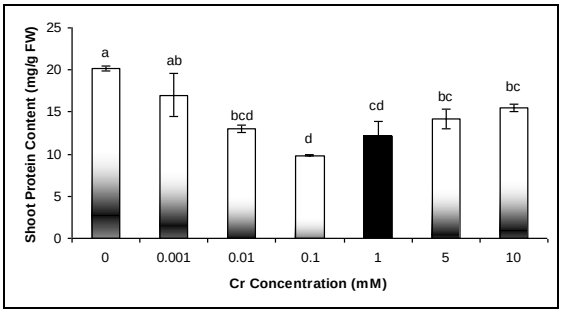
شکل ۱۰- اثر فلز کروم بر میزان آسکوربیک اسید اندام هوایی در گیاه آفتابگردان. مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن و با ۳ تکرار انجام شد. حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.



شکل ۱۱- اثر فلز کروم بر میزان دهیدروآسکوربیک اسید اندام هوایی در گیاه آفتابگردان. مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن و با ۳ تکرار انجام شد. حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.



شکل ۱۲- اثر فلز کروم بر میزان آسکوربیک اسید کل اندام هوایی در گیاه آفتابگردان. مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن و با ۳ تکرار انجام شد. حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.



شکل ۱۳ - اثر فلز کروم بر میزان پروتئین اندام هوایی در گیاه آفتابگردان. مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن و با ۴ تکرار انجام شد. حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.

پرولین اندام هوایی

تنش فلز سنگین کروم باعث افزایش معنی‌داری در میزان پرولین اندام هوایی گیاه آفتابگردان تحت غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌مولار شده و برای سایر غلظت‌ها تفاوت معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد مشاهده نشده است (شکل ۱۴).

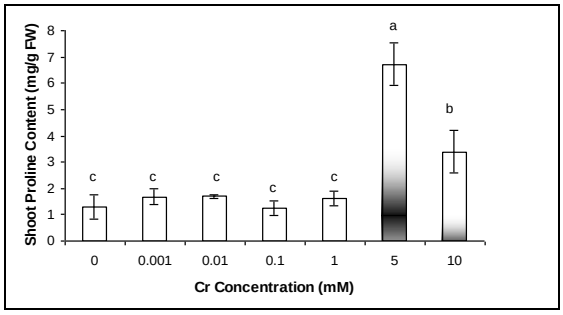
نتایج حاصل از اثر فلز کروم بر تجمع این فلز در بخش‌های مختلف اندام هوایی گیاه آفتابگردان

تجمع کروم در برگ آفتابگردان

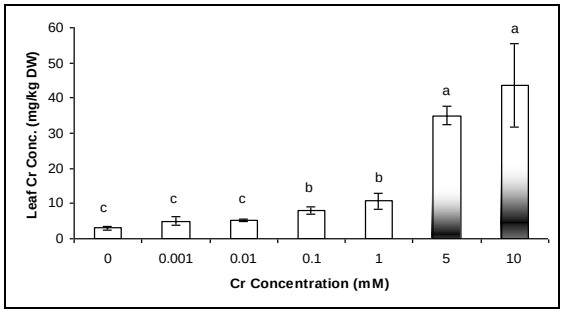
نتایج آنالیز واریانس داده‌های حاصل از اثر فلز سنگین کروم بر میزان تجمع این فلز در برگ گیاه آفتابگردان نشان داد که با افزایش غلظت کروم در محلول‌های تیمار، تجمع این فلز در برگ‌های گیاه افزایش یافته است و افزایش برای غلظت‌های ۰/۱، ۱، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار معنی‌دار بوده است (شکل ۱۵).

تجمع کروم در بذر آفتابگردان

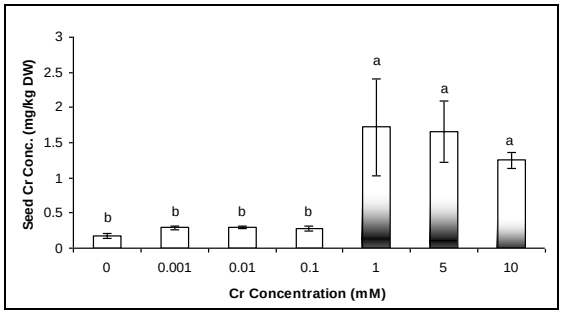
نتایج حاصل از تیمار ۶ غلظت متفاوت فلز کروم بر تجمع این فلز در بذرهای گیاه آفتابگردان با افزایش معنی‌دار برای غلظت‌های ۱، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار همراه بود و برای سایر غلظت‌ها، تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد مشاهده نشد (شکل ۱۶).



شکل ۱۴- اثر فلز کروم بر میزان پرولین اندام هوایی در گیاه آفتابگردان. مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن و با ۴ تکرار انجام شد. حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.



شکل ۱۵- اثر فلز کروم بر میزان تجمع این فلز در برگ گیاه آفتابگردان. مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن و با ۳ تکرار انجام شد. حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.



شکل ۱۶- اثر فلز کروم بر میزان تجمع این فلز در بذر گیاه آفتابگردان. مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن و با ۳ تکرار انجام شد. حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.

بحث

بررسی شاخص‌های رشد اندام هوایی آفتابگردان

رشد گیاه شاخصی اصلی برای ارزیابی وضعیت زنده‌مانی و سازگاری گیاه در شرایط زیست‌محیطی است و سرعت رشد در گیاه با شاخص‌هایی مانند سطح برگ، ماده خشک و تعداد برگ‌ها تعیین می‌شود (Shanker *et al*., 2005). کروم به عنوان عنصری غیرضروری، عموماً باعث مهار رشد در گیاهان می‌شود، هرچند که گزارش‌هایی نیز از اثر تحریک کنندگی غلظت‌های پایین کروم بر رشد در گیاهان وجود دارد (Pandey *et al*., 2005؛ Samantaray *et al*., 1998).

نتایج حاصل از این پژوهش از اثر ۶ غلظت مختلف کروم III روی گیاه آفتابگردان نشان داد که تیمار با کروم در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌مولار باعث کاهش معنی‌دار رشد طولی ساقه شد (شکل ۱). گزارش‌های متعددی از اثر بازدارندگی کروم بر رشد طولی اندام هوایی گیاهان منتشر شده است. Sundramoorthy و همکاران (۲۰۱۰) مشاهده کردند که طول اندام هوایی برنج تحت تأثیر ۷ تیمار متفاوت کروم کاهش یافت. در گزارشی دیگر، اضافه کردن کروم III به محیط کشت جداکشت‌های یونجه، نیز رشد اندام هوایی را مهار کرد (Barton *et al*., 2000). به نظر می‌رسد کاهش در ارتفاع اندام هوایی گیاه به علت کاهش رشد ریشه و در نتیجه کاهش انتقال آب و مواد غذایی به بخش‌های هوایی گیاه است. علاوه بر این، انتقال کروم به بخش هوایی گیاه می‌تواند به علت اثر مستقیم کروم بر متابولیسم سلولی اندام هوایی باشد که به کاهش ارتفاع گیاه منجر می‌شود (Shanker *et al*., 2005).

کروم می‌تواند بر سطح برگ و تعداد برگ‌ها در گیاهان نیز اثر داشته باشد. غلظت‌های بالای کروم در پژوهش حاضر اثر معنی‌داری بر سطح برگ در گیاه آفتابگردان داشت و آن را به شدت کاهش داد (شکل ۲). نتایج مشابهی از تحقیقات Tripathi و همکاران (۱۹۹۹) به دست آمده است که نشان می‌دهد غلظت‌های بالای کروم VI به میزان ۲۰۰ ppm سطح برگ و بیوماس جوانه‌های *Albiza lebbek* را کاهش می‌دهد. کاهش سطح برگ می‌تواند به علت کاهش در تعداد سلول‌های برگ‌های بازمانده از رشد در اثر سمیّت با کروم یا کاهش در اندازه آنها باشد (Panda and Choudhury, 2005).

وزن تر و خشک اندام هوایی آفتابگردان تحت تأثیر تیمار کروم نیز نتایج درخور توجهی داشت. اساساً وزن تر و خشک یک گیاه نماد عملکرد رشد گیاه است و هر عاملی که به نوعی اثر مهاری بر رشد داشته باشد باعث کاهش وزن تر و خشک گیاه می‌شود (Sundramoorthy *et al*., 2010). فلزات سنگین با اثر بر رشد و فتوسنتز به طور غیرمستقیم بیوماس گیاهی را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Shanker *et al*., 2005). در این تحقیق، با افزایش غلظت کروم، وزن تر و خشک

اندام هوایی در گیاهان آفتابگردان تحت تیمار کاهش نشان داد و این روند کاهشی در غلظت‌های ۰/۱، ۱، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار نسبت به گروه شاهد معنی‌دار بود (شکل‌های ۳ و ۴). چنین نتایجی با گزارش Zurayk و همکاران (۲۰۰۱) مبنی بر کاهش معنی‌دار بیوماس *Portulaca oleracea* تحت تأثیر کروم مطابقت دارد. گل کلم نیز هنگامی که در معرض ۰/۵ میلی‌مولار کروم VI قرار گرفت، کاهش در ماده خشک نشان داد (Chatterjee and Chatterjee, 2000).

کاهش در وزن تر و خشک اندام هوایی گیاه می‌تواند به مهار جذب آب توسط ریشه و انتقال آن به بخش‌های هوایی در اثر سمیّت کروم مربوط باشد. از طرفی کروم با مداخله در فرآیندهای متابولیک گیاهان می‌تواند باعث مهار مسیرهای آنابولیسم و تولید بیوماس گیاه شود (Sundramoorthy *et al*., 2010).

اگرچه بیشتر گزارش‌ها حاکی از اثر مهاری کروم بر تولید بیوماس گیاهی است (Vajpayee *et al*., 2001؛ Rai *et al*., 2004؛ Shanker *et al*., 2005؛ Panda, 2007؛ Vernay *et al*., 2008)، در عین حال، گزارش‌هایی وجود دارد که نشان می‌دهد مقادیر اندک کروم III باعث تحریک رشد در گیاهان می‌شود (Bishnoi *et al*., 1993؛ Samantaray *et al*., 1998). گزارش شده است که غلظت‌های پایین کروم باعث تحریک رشد گیاهان، افزایش نمو و فعالیت فتوسنتزی می‌شود (El-Bassam, 1978). با وجود این، شواهد کافی در مورد نیاز گیاهان به کروم برای رشد هنوز ارایه نشده است.

بررسی رنگیزه‌های فتوسنتزی

گزارش‌های متعددی مبنی بر اثر کروم بر محتوای کلروفیل و کاروتنوئید در گیاهان وجود دارد. بیشتر یافته‌ها حاکی از کاهش محتوای رنگیزه‌ای کلروپلاست تحت تأثیر کروم است (Panda *et al*., 2002؛ Panda and Khan, 2003؛ Choudhury and Panda, 2004؛ Hu *et al*., 2005؛ Shanker *et al*., 2005). با وجود این، شواهدی نیز از اثر افزایشی غلظت‌های پایین کروم بر محتوای رنگیزه‌ای برگ گیاهان تحت تنش گزارش شده است (El-Bassam, 1978; Samantaray *el al*., 1998). در این پژوهش، محتوای کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئیدهای گیاه آفتابگردان تحت غلظت‌های بالای کروم III افزایش معنی‌داری نشان داد (شکل‌های ۵، ۶، ۷ و ۸). این نتایج با نتایج Barcelo و همکاران (۱۹۸۶) در مورد افزایش میزان کلروفیل و کاروتنوئیدهای گیاه لوبیا تحت تیمار کروم VI مطابقت دارد. همچنین، Pandey و همکاران (۲۰۰۵) گزارش کرده‌اند که کروم VI سبب افزایش معنی‌دار در میزان کلروفیل و کاروتنوئیدهای خردل (*Brassica juncea* cv. Pusa Jaikisan) شده است. به نظر می‌رسد افزایش محتوای رنگیزه‌ای برگ‌های آفتابگردان در غلظت‌های بالای کروم می‌تواند به علت تجمع رنگیزه‌ها در برگ‌های رشد نیافته در اثر سمیّت کروم باشد. به عبارتی، کاهش معنی‌دار در رشد گیاه آفتابگردان تحت غلظت‌های بالای کروم همراه با تجمع معنی‌دار رنگیزه‌های فتوسنتزی در این غلظت‌هاست. از سوی دیگر، El-Bassam (۱۹۷۸) گزارش داده است که غلظت‌های پایین کروم III باعث ترغیب رشد و تحریک سنتز کلروفیل و فعالیت فتوسنتزی می‌شود. همچنین، گزارش شده است که تولید گونه‌های فعال اکسیژن به ویژه اکسیژن یکتایی تحت تأثیر یون‌های کروم می‌تواند افزایش یابد (Pallet and Young,

(1993. یکی از علت‌های افزایش میزان کاروتنوئیدها در پژوهش حاضر می‌تواند نقش حفاظتی این ترکیبات در واکنش با گونه‌های فعال اکسیژن و جلوگیری از آغاز فرآیند پراکسیداسیون لیپیدها باشد.

اثر کروم بر القا تنش اکسیداتیو در اندام هوایی آفتابگردان

یکی از پاسخ‌های عمومی به گستره وسیعی از تنش‌های زیستی و غیرزیستی، تولید گونه‌های اکسیژن فعال یا ROS است. فلزات سنگین باعث تولید ROS در سلول‌ها می‌شوند که این پدیده پاسخی بر تنش محسوب می‌شود (Dietz *et al*., 1999). کروم فلزی سنگین و سمّی است که می‌تواند گونه‌های ROS از قبیل H_2O_2، O_2^- و OH^- تولید کند که باعث آسیب اکسیداتیو به گیاهان می‌شوند (Panda and Patra, 1997؛ Panda and Patra, 2000؛ Panda and Patra, 2002؛ Dixit *et al*., 2002؛ Panda, 2003؛ Panda and Khan, 2003؛ Choudhury and Panda, 2004).

گیاهان در معرض غلظت‌های سمّی کروم، در اثر تنش اکسیداتیو ایجاد شده، دچار آسیب ساختمانی و عملکردی می‌شوند (Shanker *et al*., 2005). هنگامی که گیاهان در معرض غلظت‌های مختلف کروم قرار می‌گیرند، فرآیند پراکسیداسیون لیپیدی آغاز می‌شود. محصول پراکسیداسیون لیپیدها مالوندی‌آلدئید (MDA) است که به عنوان شاخص تنش اکسیداتیو در نظر گرفته می‌شود. در این تحقیق، نتایج حاصل از غلظت‌های مختلف کروم بر تولید مالوندی‌آلدئید اندام هوایی در گیاه آفتابگردان نشان داد که کمپلکس تیوباربیتوریک اسید (TBA) با مالوندی‌آلدئید در غلظت‌های پایین کروم تفاوت معنی‌داری با گیاه شاهد نشان نمی‌دهند، در حالی که غلظت‌های سمّی این فلز، محتوای این ترکیبات و در نتیجه پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی را افزایش داده است (شکل ۹). بر اساس این نتایج، به نظر می‌رسد که سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه آفتابگردان در غلظت پایین فلز سنگین کروم توانایی از بین بردن رادیکال‌های آزاد را داشته، از خسارت اکسیداتیو به گیاه جلوگیری کرده است، در حالی که تجمع بالای گونه‌های فعال اکسیژن در غلظت‌های بالای کروم بر سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه غلبه کرده، پراکسیده شدن لیپیدهای غشایی را افزایش داده است. گزارش شده است در گندم نیز تحت تیمارهای ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار کروم فرآیند پراکسیداسیون لیپیدها آغاز شد و محتوای مالوندی‌آلدئید (MDA) گیاه با افزایش غلظت کروم افزایش یافته است (Panda and Khan, 2003).

گیاهان مکانیسم‌های دفاعی متعددی برای کنترل و خنثی کردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن به کار می‌گیرند. آنها سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی با سازوکارهای آنزیمی و غیرآنزیمی دارند که می‌توانند رادیکال‌های آزاد اکسیژن را از بین برده، خسارات ناشی از تنش اکسیداتیو را تخفیف دهد (Panday *et al*., 2002; Karuppanapandian *et al*., 2009). سیستم دفاعی غیرآنزیمی در گیاهان سنتز برخی از ترکیبات آنتی‌اکسیدان مانند آنتوسیانین‌ها، کاروتنوئیدها، توکوفرول‌ها، آسکوربیک اسید و ترکیبات فنلی مانند فلاونوئیدها را القا می‌کند. این ترکیبات آنتی‌اکسیدان با رادیکال‌های آزاد واکنش داده، با دادن الکترون به این رادیکال‌های واکنش پذیر آنها را به شکل پایدار خود تبدیل می‌کنند (Tripathi *et*

(*al.*, 1999). از جمله این ترکیبات آنتی‌اکسیدان، آسکوربیک اسید است که در گیاهان وجود داشته، نقش اساسی در سیستم دفاع غیرآنزیمی به عهده دارد.

در این تحقیق، با افزایش غلظت کروم نسبت دی‌هیدروآسکوربیک اسید به آسکوربیک اسید (DHA/ASC) اندام هوایی افزایش یافت که این نتایج با یافته‌های Rai و همکاران (۲۰۰۴) مبنی بر کاهش آسکوربیک اسید در گیاه *Ocimum tenoiflorum* تحت تنش کروم VI مطابقت دارد. به اعتقاد Cho و Seo (۲۰۰۵) احتمالاً به علت ورود گلوتاتیون احیاء در مسیر سنتز فیتوکلاتین‌ها و در نتیجه کاهش سوبسترای کاهنده آسکوربیک اسید و یا به علت کاهش فعالیت آنزیم‌های درگیر در چرخه اکسید و احیاء آسکوربیک اسید، نسبت دی هیدروآسکوربیک اسید به آسکوربیک اسید افزایش می‌یابد که احتمالاً کاهش در آسکوربیک اسید در این تحقیق در غلظت‌های بالای کروم می‌تواند به این علت باشد. چنین نتایجی از اثر فلزات سنگین دیگر نیز بر گیاه آفتابگردان گزارش شده است. پژوهش Di Cagno و همکاران (۲۰۰۱) نشان داد، هنگامی که آفتابگردان در معرض غلظت‌های بیش از ۱۰۰ میکرومولار کادمیوم قرار گرفت نسبت DHA/ASC افزایش یافت. به نظر می‌رسد این تغییرات احتمالاً به علت تغییر در فعالیت آنزیم‌های درگیر در چرخه اکسید و احیاء آسکوربیک اسید از جمله دی‌هیدروآسکوربیک اسید ردوکتاز (DHAR) و مونودی‌هیدروآسکوربیک اسید ردوکتاز (MDHAR) باشد.

در این تحقیق، میزان آسکوربیک اسید کل (آسکوربیک اسید+ دی هیدرو آسکوربیک اسید) در اندام هوایی آفتابگردان در سطوح بالای فلز کروم نسبت به گیاه شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافته است. افزایش محتوای آسکوربیک اسید کل (شکل ۱۲) بیانگر این مطلب است که در غلظت‌های استفاده شده فلز سنگین کروم در این پژوهش، آسکوربیک اسید به عنوان ترکیب آنتی‌اکسیدان در گیاه آفتابگردان ایفای نقش کرده است؛ زیرا میزان دهیدروآسکوربیک اسید در این غلظت‌ها بالا رفته، در حالی که میزان آسکوربیک اسید کاهش داشته است. بنابراین، به نظر می‌رسد که آسکوربیک اسید نقش خود را احتمالاً از طریق چرخه آسکوربیک اسید-گلوتاتیون اعمال کرده است.

اثر کروم بر محتوای پرولین و پروتئین اندام هوایی آفتابگردان

بسیاری از تنش‌های محیطی از قبیل فلزات سنگین، اشعه ماوراء بنفش، گرما و خشکی باعث افزایش سطح پرولین در گیاهان می‌شود. بیش از ۴۰ سال است که فیزیولوژیست‌های گیاهی، تجمع پرولین آزاد را در گونه‌های مختلف در تنش اسمزی بالا به عنوان یک شاخص مدنظر قرار می‌دهند (Zengin and Munzuroglu, 2005). تجمع پرولین آزاد در پاسخ به حضور فلزات سنگین در میان گیاهان به طور گسترده صورت می‌گیرد (Cohen *et al.*, 1993). در گزارش‌های علمی، عملکرد پرولین در گیاهان تحت تنش اغلب به علت ویژگی اسمولیت آن برای حفظ تعادل آب گیاه بیان شده است (Delauney and Verma, 1993؛ Saradhi *et al.*, 1995). با این حال، سایر نقش‌های مفید پرولین تحت شرایط تنش از قبیل حفظ ثبات پروتئین‌ها، خورندگی رادیکال‌های

هیدروکسیل، تنظیم pH سلولی و تنظیم نسبت NAD/NADH نیز توسط محققان گزارش شده است (Matysik *et al.*, 2002). اما مکانیسم‌های مولکولی واضح که چگونه پرولین مقاومت گیاه را در مقابل تنش افزایش می‌دهد، هنوز کاملاً شناخته نشده است.

در شرایط آزمایشگاهی مشاهده شده است که غلظت‌های بالای پرولین، اکسیژن یکتایی را کاملاً خاموش می‌کند و نقش خاموش‌کنندگی آن به اثبات رسیده است. همچنین، گزارش شده که پرولین به خوبی می‌تواند رادیکال‌های هیدروکسیل را حذف کند و بدین ترتیب، ماکرومولکول‌های اساسی سلول مانند پروتئین‌ها، لیپیدها و DNA را از خطرات رادیکال‌های آزاد حفظ کند (Matysik *et al.*, 2002). در تحقیق حاضر نیز، میزان پرولین اندام هوایی آفتابگردان با افزایش غلظت کروم برای گیاهان تحت تیمار (غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌مولار)، افزایش معنی‌داری نشان داد (شکل ۱۴) که به نظر می‌رسد افزایش مقدار پرولین تحت تنش فلز سنگین در این آزمایش، هم به ویژگی اسمولیتی آن و هم به ویژگی آنتی‌اکسیدانی آن در شرایط تنش مربوط باشد.

محتوای کل پروتئین اندام هوایی گیاه آفتابگردان تحت تنش کروم نسبت به گروه شاهد کاهش نشان داد (شکل ۱۳). گزارش شده است که کاهش در محتوای پروتئینی در غلظت‌های بالای یون می‌تواند به علت کاهش در سنتز بعضی پروتئین‌ها یا احتمالاً افزایش فعالیت آنزیم‌های پروتئولیتیک باشد (Khudsar *et al.*, 2001). بنا بر گزارش Palma و همکاران (۲۰۰۲) پروتئولیز نیز به عنوان جزو مهمی همراه با اکسیداسیون پروتئین در شرایط تنش اکسیداتیو توسط فرآیندهای پیری و فلزات سنگین القا می‌شود. از طرف دیگر کاهش در محتوای پروتئین گیاهان تحت تیمار با غلظت‌های بالای کروم می‌تواند به اثر متفاوت گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) مربوط باشد، به گونه‌ای که ROS با صدمه زدن به پروتئوم گیاه باعث نابودی شمار زیادی از پروتئین‌های گیاه می‌شود (Sandramoorthy *et al.*, 2010).

تجمع فلز سنگین کروم در بخش‌های هوایی آفتابگردان

علاوه بر آثار کروم بر شاخص‌های فیزیولوژیک و رشد، مکان‌یابی نهایی کروم III به منظور تخمین تجمع کروم در بخش‌های مختلف گیاه آفتابگردان ضروری به نظر می‌رسد. آفتابگردان گیاهی خوراکی با مصرف بالا برای انسان به شمار می‌رود. از این رو، بررسی تجمع کروم به عنوان فلز سنگین سمّی در بخش‌های خوراکی آفتابگردان یکی از اهداف اصلی این پژوهش بوده است. بنا به گفته Zayed و همکاران (۱۹۹۸) تجمع بیش از حد فلز سنگین در قسمت‌های خوراکی گیاهان باعث می‌شود این فلزات وارد زنجیره غذایی شده، خسارت‌های جبران ناپذیری را به سلامت انسان و دام وارد نمایند.

در این تحقیق، تجمع فلز سنگین کروم در بذرهای آفتابگردان به عنوان گیاه دانه روغنی مهم بررسی و ارزیابی شد. نتایج نشان داد که تجمع کروم در بذرهای حاصل از آفتابگردان تحت تیمار غلظت‌های ۱، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌دار داشته است (شکل ۱۶) و این افزایش در حدی است که می‌تواند برای استفاده‌های خوراکی مخاطره‌آمیز باشد. میزان نیاز روزانه بدن انسان به کروم

در محدوده ۵۰ تا ۲۰۰ میکروگرم برآورد شده است (Anderson, 1997). در این پژوهش، میزان تجمع کروم در بذرهای حاصل از گیاهان آفتابگردان تحت تیمار با غلظت‌های یاد شده، بسیار بیشتر از این محدوده است. بنابراین، اگرچه میزان تجمع کروم در بذر آفتابگردان در مقایسه با میزان تجمع آن در ریشه (پیروز و همکاران، ۱۳۹۰) بسیار ناچیز است، چنین نتیجه‌ای می‌تواند به عنوان هشداری سودمند در استفاده کنترل شده از گیاهان خوراکی رشد یافته در خاک‌های آلوده به فلزات سنگین از جمله کروم در نظر گرفته شود.

جمع‌بندی

با توجه به نتایج حاصل، فلز کروم III در غلظت‌های پایین تأثیر معنی‌داری بر رشد و عوامل فیزیولوژیک و بیوشیمیایی در اندام هوایی گیاه آفتابگردان ندارد، اما غلظت‌های بالای کروم (بالاتر از ۵ میلی‌مولار) به عنوان مهارکننده رشد عمل کرده، باعث بروز آثار سمّی بر اندام هوایی گیاه می‌شود. آثار بارز سمّی کروم بر اندام هوایی آفتابگردان را می‌توان کاهش طول، کاهش وزن تر و خشک اندام هوایی و کاهش سطح برگ برشمرد. بررسی‌های فیزیولوژیک انجام شده نشان داد که میزان پروتئین اندام هوایی گیاه تحت تیمار غلظت‌های بالای کروم کاهش یافته است. کاهش در محتوای پروتئین اندام هوایی را می‌توان نتیجه پروتئولیز بخش زیادی از پروتئین‌های گیاه در مواجهه با تنش فلز سنگین کروم دانست. از طرفی، افزایش در میزان پرولین اندام هوایی در تیمار با کروم می‌تواند هم به ویژگی اسمولیتی آن و هم ویژگی آنتی‌اکسیدانی آن در شرایط تنش مربوط باشد. محتوای آسکوربیک اسید اندام هوایی گیاهان تحت تیمار با کروم با افزایش غلظت کروم کاهش نشان داد، در حالی که میزان دهیدروآسکوربیک اسید و آسکوربیک اسید کل افزایش یافت. کاهش محتوای آسکوربیک اسید در غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۱، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار کروم نسبت به گروه شاهد معنی‌دار بود. بنابراین، به نظر می‌رسد آسکوربیک اسید به عنوان یک مکانیسم دفاع غیر آنزیمی نقشی کلیدی در ایجاد مقاومت آفتابگردان در برابر تنش اکسیداتیو القا شده توسط فلز سنگین کروم ایفا کرده است. ارزیابی میزان تجمع کروم در اندام هوایی آفتابگردان نشان داد که میزان تجمع در بذرهای آفتابگردان با افزایش معنی‌دار برای غلظت‌های ۱، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار همراه بود و این افزایش بیش از محدوده نیاز روزانه بدن انسان به کروم است. بنابراین، چنین نتیجه‌ای می‌تواند هشداری سودمند در استفاده کنترل شده از گیاهان خوراکی رشد یافته در خاک‌های آلوده به فلزات سنگین از جمله کروم باشد.

منابع

پیروز، پ.، منوچهری کلانتری، خ و نصیبی، ف. (۱۳۹۰) بررسی فیزیولوژیک گیاه آفتابگردان تحت تنش فلز سنگین کروم: تأثیر بر رشد، تجمع و القای تنش اکسیداتیو در ریشه آفتابگردان (*Helianthus annuus*). مجله زیست‌شناسی گیاهی ۱۱: ۷۳-۸۶.

Anderson, R. A. (1997) Chromium as an essential nutrient for humans. Regulatory Toxicology and Pharmacology 26: 35-41.

Barbosa, R. M., Almeida, A. F. and Mielke, M. S., (2007) A physiological analysis of *Genipa Americana* L.: a potential phytoremediator tree for chromium polluted watersheds. Environmental and Experimental Botany 61: 246-271.

Barcelo, J., Poschenrieder, C. and Gunse, B. (1986) Water relations of chromium VI treated bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Contender) under both normal and water stress condition. Journal of Experimental Botany 37: 178-187.

Barnhart, N. (1997) Chromium and its soils in the proximity of the old tannery waste lagoon. International Agrophysics 15: 121-124.

Barton, L. L., Johnson, A. G. and Wagener B. M. (2000) Inhibition of ferric chelate reductase in alfalfa roots by cobalt, nickel, chromium and copper. Journal of Plant Nutrition 23: 1833-1845.

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

Becquer, T., Quantin, C., Sicot, M. and Boudot, J. P. (2003) Chromium availability in ultramafic soils from New Caledonia. Science of the Total Environment 301: 251-261.

Bishnoi, N. R., Chugh, L. K. and Sawhney, S. K. (1993) Effect of chromium on photosynthesis, respiration and nitrogen fixation in pea (*Pisum sativum* L.) seedlings. Journal of Plant Physiology 142: 25-30.

Bonet, A., Poschenrieder, C. and Barcelo, J. (1991) Chromium III ion interaction in Fe-deficient and Fe-sufficient bean plants. I. Growth and Nutrient content. Journal of Plant Nutrition 14: 403-414.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Chatterjee, J. and Chatterjee, C. (2000) Phtotoxicity of cobalt, chromium and copper in cauliflower. Environmental Pollution 109: 69-74.

Cho, U. and Seo, N. (2005) Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. Plant Science 168: 113-120.

Choudhury, S. and Panda, S. K. (2004) Role of salicylic acid in regulating cadmium induced oxidative stress in *Oryza sativa* L. roots. Bulgarian Journal of Plant Physiology 30(3-4): 95-110.

Cohen, M. D., Kargacin, B., Klein, C. B. and Costa, M. (1993) Mechanism of chromium carcinogenicity and toxicity. Critical Reviews in Toxicology 23: 255-281.

de Pinto, M. C., Tommasi, F. and De Gara, L. (2000) Enzymes of the ascorbate biosynthesis and ascorbate-glutathione cycle in cultured cells of tobacco Bright Yellow 2. Plant Physiology and Biochemistry 38: 541-550.

Delauney, A. and Verma, D. P. S. (1993) Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. Plant Journal 4: 215-223.

Dhir, B., Sharmila, P., Pardha Saradhi, P. and Abdul Nasim, S. (2009) Physiological and antioxidant responses of *Salvinia natans* exposed to chromium-rich wastewater Ecotoxicology and Environmental Safety 72: 1790-1797.

Di Cagno, R., Guidi, L. and De Gara, L. (2001) Combined cadmium and ozone treatments affectphotosynthesis and ascorbate dependent defences in sunflower. New Phytologist 151: 627-636.

Dietz, K. J., Baier, M. and Krämer, U. (1999) Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. In: Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystems (eds. Prasad, M. N. V. and Hagemeyer, J.) 73-97. Springer-Verlag, Berlin.

Dixit, V., Pandey, V. and Shyam, R. (2002) Chromium ions inactivate electron transport and enhance superoxide generation in vivo in pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad) root

mitochondria. Plant, Cell and Environment 25: 687-690.

El-Bassam, N. (1978) Spurendemente: nahrstoffe und gift zugleich. Kali-Briefe (Büntehof) 14: 255-272.

Han, F. X., Maruthi, B. B., Monts, D. L. and Su, Y. (2004) Phytoavailability and toxicity of trivalent and hexavalentchromium to Brassica juncea. New Phytologist 162: 489-499.

Heath, R. L. and Packer, L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. 1. Kinetics and stechiometry of fatty acid peroxidation. Archives in Biochemistry Biophysics 125: 189-198.

Hu, J., Chen, G. and Irene, M. (2005) Removal and recovery of Cr VI from wastewater by maghemite nanoparticles. Waters Research 39: 4528-4536.

Karuppanapandian, T., Sinha, P. B., Kamarul Haniya, A. and Manoharan, K. (2009) Chromium-induced accumulation of peroxide content, stimulation of antioxidative enzymes and lipid peroxidation in green (*Vigna radiata* L. cv. Wilczek) leaves. African Journal of Biotechnology 8: 475-479.

Khudsar, T., Zafar, M. and Iqbal, M. (2001) Cadmium-induced changes in leaf epidermis, photosynthetic rate and pigment concentrations in *Cajanus Cajun*. Biologia Plantarum 44(1): 59-64.

Lichtenthaler, H. K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic membranes. Methods in 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.

Lozak, A., Soltyk, K., Ostapczuk, P. and Fijalek, Z. (2002) Determination of selected trace elements in herbs and their infusions. Science of the Total Environment 289: 33-34.

Matysik, J., Alia Bhalu, B. and Mohanty, P. (2002) Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. Current Science 82: 525-532.

Mc Grath, S. P. (1985) The uptake and translocation of tri- and hexa- valent chromium and effects of the growth of oat in flowing nutrient solution and in soil. New Physiologist 92: 381-390.

Meidner, H. (1984) Class Experiments in Plant Physiology. George, Allen and Unwin (Publishers) Ltd., London.

Nriagu Jerome, O. and Nieboer, E. (1988) Chromium in the natural and human environments. Advances in Invironmental Sciences and Technology 20: 130-147.

Pallet, K. E. and Young, A. J. (1993) Carotenoids. In: Antioxidants in higher plants (eds. Alscher, R. G. and Hess, J. L.) 59-89. CRC Press, Boca Raton.

Palma, J. M., Sandalio, L. M., Corpas, F. J., Romero-Puertas, M. C., McCarthy, I. and Rio, L. A. (2002) Plant proteases, protein degradation and oxidative stress: role of peroxisomes. Plant Physiology and Biochemistry 40: 521-530.

Panda, K. S. (2007) Chromium-mediated oxidative stress and ultrastructural changes in root cells of developing rice seedlings. Journal of Plant Physiology 164: 1419-1428.

Panda, S. K. (2003) Heavy metal phytotoxicity induces oxidative stress in *Taxithelium* sp. Current Science 84: 631-633.

Panda, S. K. and Choudhury, S. (2005) Chromium stress in plants. Brazilian Journal of Plant Physiology 17: 95-192.

Panda, S. K. and Khan, M. H. (2003) Antioxidant efficiency in rice (*Oryza sativa* L.) leaves under heavy metal toxicity. Plant Biology 30: 23-29.

Panda, S. K. and Patra, H. K. (1997) Physiology of chromium toxicity in plants- a review. Plant Physiology and Biochemistry 24(1): 10-17.

Panda, S. K. and Patra, H. K. (2000) Nitrate and ammonium ions effect on the chromium toxicity in developing wheat seedlings. Proceedings of the National Academy of Sciences India. Section B, Biological Sciences 70: 75-80.

Panda, S. K., Mahapatra, S. and Patra, H. K. (2002) Chromium toxicity and water stress simulation effects in intact senescing leaves of greengram (*Vigna radiata* L. var Wilckzeck K851). In: Advances in stress physiology of plants (ed. Panda, S. K.) 129-136.

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.

Prasad, M. N. V. and Strzaka, K. (2002) Physiology and biochemistry of metal toxicity and tolerance in plants. Plant Sciences 161: 881-889.

Rai, V., Vajpayee, P., Singh, S. N. and Mehrotra, S. (2004) Effects of chromium accumulation on photosynthetic pigments, oxidative stress defense system, nitrate reduction, praline level and eugenol content of *Ocimum tenuiflorum* L. Plant Science 167: 1159-1169.

Samantaray, S., Rout, G. R. and Das, P. (1998) Role of chromium on plant growth and metabolism, Acta Physiologiae Plantarum 20: 201-212.

Sankar Ganesh, K., Baskaran, L., Rajasekaran, S., Sumathi, K., Chidambaram, A. L. A. and Sundaramoorthy, P. (2008) Chromium stress induced alternations in biochemical and enzyme metabolism in aquatic and terrestrial plants. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 63: 159-163.

Saradhi, P. P., Alia, A. S. and Prasad, K.V. (1995) Proline accumulatiom in plants exposed to UV radiation and pratect them against UV induced peroxidiation. Biochemical and Biophysical Research Communications 209: 1-5.

Shanker, K. A., Cervantes, C., Loza-Taversa, H. and Avudainayagam, S. (2005) Chromium toxicity in plants. Environment International 31:739-753.

Shrivastava, R. K., Upreti, P. K., Seth, U. C. and Chaturvedi, U. C. (2002) Effects of chromium on the immune system. FEMS Immunology and Medical Microbiology 34: 1-7.

Sinha, S., Saxena, R. and Singh, S. (2005) Chromium induced lipid peroxidation in the plants of *Pistia stratiotes* L.: role of antioxidants and antioxidant enzymes. Chemosphere 58: 595-404.

Sreejayan, N., Dong, F., Kandadi, M. R., Yang, X. and Ren, J. (2008) Insulin resistance and hepatic ER stress in obese mice. Obesity 16: 1331-1337.

Sundaramoorthy, P., Alagappan, C., Kaliyaperumal, S. G., Pachikkaran, U. and Logalashmanan, B. (2010) Chromium stress in paddy: (i) Nutrient status of paddy under chromium stress; (ii) Phytoremediation of chromium by aquatic and terrestrial weeds. Comptes Rendus Biologies 333: 597-607.

Tripathi, A. K., Sadhna, T. and Tripathi, S. (1999) Changes in some physiological and biochemical characters in Albizia lebbek as bio-indicators of heavy metal toxicity. Journal of Environmental Biology 20: 93-98.

Vajpayee, P., Rai, U. N., Ali, M. B., Tripathi, R. D., Yadav, V., Sinha, S. and Singh, S. N. (2001) Chromium-induced physiologic changes in *Vallisneria spiralis* L. and its role in phytoremediation of tannery effluent. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 67: 246-256.

Vernay, P., Gauthier-Moussard, C., Jean, L., Bordas, F., Faure, O., Ledoigt, G. and Hitmi, A., (2008) Effect of chromium species on phytpchemical and physiological parameters in *Datura innoxia*. Chemosphere 72: 763-771.

Zayed, A., Lytle, C. M., Jin-Hong, Q., Terry, N. and Qian, J. H. (1998) Chromium accumulation, translocation and chemical

speciation in vegetable crops. Planta 206: 293-299.

Zengin, F. K. and Munzuroglu, O. (2005) Effects of some heavy metals on content of chlorophyll, proline and some antioxidant chemicals in bean. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica 47: 157-164.

Zurayk, R., Sukkariyah, B. and Baalbaki, R. (2001) Common hydrophytes as bioindicatorsof nickel, chromium and cadmium pollution. Water, Air and Soil Pollution 127: 373-388.

Effect of the heavey metal of chromium on growth, bioaccumulation and oxidative stress induction on shoots of sunflower (*Helianthus annuus*)

Pariya Sadat Pirooz and Khosrow Manouchehri Kalantari *

Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University, Kerman, Iran

Abstract

Chromium (Cr) as the seventh most abundant element in the Earth crust, can enhance growth of plants in low concentrations. However, excess Cr is highly toxic to animals and plants. Chromium also can cause oxidative stress in plants by producing free radicals. In this research, effects of various concentrations of Cr on some growth parameters of sunflower (*Helianthus annuus*)'s shoot were studied. Also, the effect of Chromium in inducing oxidative stress on the sunflower's shoot investigated, as well. Cr treatments applied in six concentrations 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 5 and 10 mM on 4-week sunflower plants and one control group. Plants were allowed to grow under Cr treatments for three weeks before they were harvested. The results demonstrated that the 5 and 10 mM concentrations of Cr decreased the growth parameters of shoot (such as: fresh and dry weight, leaf area and also the length of stems), whereas, the lower concentrations, no significant differences were shown compared to the control. MDA content of plants' shoots significantly increased in 1, 5 and 10 mM concentrations of Cr. Shoot proline concentration was built up as Cr concentration increased in the treated plants, whereas, protein content decreased. Ascorbate content of plants decreased in 0.1, 1, 5 and 10 mM concentrations of Cr, but, dehydroascorbate and total ascorbate increased. It was concluded that ascorbic acid can play a key role in the tolerance of sunflower against oxidative stress induced by chromium. Chromium accumulation in seeds, showed increase in 5 and 10 mM concentrations. Thus, it is so important to pay more attention to use safe edible plants for both humans and animals, as well.

Key words: Ascorbic acid, Sunflower (*Helianthus annuus*), Proline, Total Protein, Accumulation, Oxidative stress, Chromium, Growth parameters

* Corresponding Author: kalantari@mail.uk.ac.ir