

تأثیر سطوح مختلف نیکل در محلول غذایی حاوی نترات آمونیوم بر پراکسیداسیون لیپید و فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان برگ خیار

هدی بهمن زیاری^۱، امیرحسین خوشگفتارمنش^۱، آزاده سنایی استوار^{۲*}، مهران شیروانی^۱ و مریم حقیقی^۳

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۹/۱۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۴/۸)

چکیده

نیکل در غلظت‌های بسیار کم برای گیاهان ضروری شناخته شده است؛ اما در غلظت زیاد در گیاه ایجاد سمیت می‌کند. در این پژوهش، تأثیر سطوح مختلف عنصر نیکل (صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار از منبع کلرید نیکل) بر پاسخ آنتی‌اکسیداتیو برگ ارقام سوپر دامینوس و نگین خیار (*Cucumis sativus* L.) در محلول غذایی حاوی نترات آمونیوم به‌عنوان منبع نیتروژن بررسی شد. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت نیکل محلول غذایی و گذشت زمان، غلظت نیکل برگ هر دو رقم خیار افزایش یافت. این افزایش در مرحله بعد از گل‌دهی بیشتر از مرحله رشد رویشی بود. هم‌چنین غلظت مالون‌دی‌آلدئید تولید شده در مرحله رشد رویشی در مقایسه با مرحله بعد از گل‌دهی بیشتر بود. کاربرد ۵۰ میکرومولار نیکل سبب کاهش معنی‌دار غلظت مالون‌دی‌آلدئید تولید شده بر اثر پراکسیداسیون لیپیدها در مقایسه با شاهد (بدون نیکل) شد. تأثیر نیکل بر فعالیت آنزیم کاتالاز بسته به رقم خیار و غلظت این عنصر در محیط کشت متفاوت بود. در رقم سوپر دامینوس، فعالیت آنزیم کاتالاز در مرحله رشد رویشی تحت تأثیر کاربرد نیکل قرار نگرفت. در حالی که در رقم نگین، کاربرد نیکل موجب کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز برگ در مقایسه با شاهد شد. در مرحله بعد از گل‌دهی، کاربرد نیکل در هر دو رقم خیار باعث کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز در مقایسه با شاهد شد. نتایج نشان داد که در مرحله رشد رویشی، کاربرد ۵۰ میکرومولار نیکل در محیط کشت موجب کاهش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در هر دو رقم خیار در مقایسه با شاهد شد و با افزایش سطح نیکل به ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار، فعالیت این آنزیم افزایش یافت. در مرحله بعد از گل‌دهی، فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز برگ بسته به رقم خیار و غلظت این عنصر در محیط کشت متفاوت بود. براساس نتایج پژوهش حاضر، به‌طور کلی، تأثیر نیکل بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان برگ خیار بسته به رقم گیاه، سطح نیکل و نوع آنزیم متفاوت است.

واژه‌های کلیدی: تنش اکسیداتیو، کاتالاز (CAT)، گایاکول پراکسیداز (GPX)، آسکوربات پراکسیداز (APX)

۱. گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

۲. مرکز پژوهشی کشت بدون خاک، دانشگاه صنعتی اصفهان

۳. گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

*: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: sanaeiazadeh@yahoo.com

مقدمه

نیکل یک عنصر غذایی کم‌نیاز بوده و به‌عنوان یک کوفاکتور برای فعالیت آنزیم اوره‌آز، نقش منحصر به فردی را در متابولیسم ترکیبات نیتروژن‌دار، هنگام شکستن پروتئین‌ها به اسیدهای آمینه در فرآیندهای جوانه‌زنی دانه و تشکیل میوه، ایفا می‌کند (۹ و ۲۹). در مطالعات اخیر نیز حضور نیکل در مکان‌های فعال آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در سیانوباکتری‌های آزادی شناسایی شده است (۶۶). در مجموع، تا به امروز، هفت دسته از آنزیم‌های وابسته به نیکل شناسایی شده‌اند. دو دسته از این آنزیم‌ها اوره‌آز و گلی‌اکسیلاز می‌باشند که دارای واکنش‌های غیرکاهشی هستند و پنج دسته باقیمانده شامل Ni-سوپر اکسید دیسموتاز، متیل کوآنزیم M ریداکتاز، کربن مونوکسید دهیدروژناز، استیل کوآنزیم A سینتتاز و هیدروژناز، دارای واکنش اکسایش و کاهش می‌باشند (۷). امروزه، نقش اختصاصی نیکل در باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن نیز به اثبات رسیده است. در این باکتری‌ها، آنزیم هیدروژناز فعال بوده (۱۲) و بنابراین برای رسیدن به بیشینه تثبیت نیتروژن، حضور نیکل ضروری است (۱). در شرایط کمبود نیکل، فعالیت آنزیم اوره‌آز و هم‌چنین تولید پروتئین، اسیدهای آلی و نیتروژن کل کاهش یافته و با انباشتگی اوره، نترات و برخی اسیدهای آمینه در گیاه همراه است. به‌طوری‌که یکی از نشانه‌های ظاهری کمبود نیکل، بافت‌مردگی (نکروزه شدن) برگ گیاه می‌باشد (۷). از دیگر نشانه‌های کمبود نیکل در گیاهان می‌توان به کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بر اثر انباشتگی متابولیت‌های سمی اوره و نترات در گیاه، که باعث ایجاد خسارت اکسیداتیو و آسیب رساندن به ساختار غشاء سلولی می‌گردد، اشاره نمود (۷).

با وجود نقش تغذیه‌ای نیکل در غلظت‌های بسیار کم، نیکل به‌عنوان یک فلز سنگین، در غلظت‌های زیاد برای گیاه، انسان و دام سمی می‌باشد (۷). سمیت نیکل به‌عنوان یک تنش غیرزیستی، با برهم زدن تعادل بین تولید و تخریب، منجر به انباشتگی رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) و ایجاد خسارات

اکسیداتیو نظیر اکسیداسیون لیپیدهای غشا و تخریب پروتئین‌ها، آنزیم‌ها، رنگدانه‌ها، مولکول کلروفیل و DNA شده و با مختل کردن عملکرد غشا، مقدار آب بافت‌های سلولی را کاهش می‌دهد (۸، ۱۰، ۴۲، ۵۴ و ۶۰). نیکل در غلظت‌های زیاد به‌صورت غیرمستقیم از طریق مسیرهای متابولیک و یا شرکت در فرآیندهای انتقال الکترون در غشا باعث ایجاد یا تشدید خسارت اکسیداتیو در سلول‌های گیاهی می‌شود. بر طبق گزارش لئون و همکاران (۳۷)، احمد و همکاران (۱) و علی و همکاران (۳)، غلظت‌های سمی نیکل سبب کاهش جوانه‌زنی بذر، کاهش رشد گیاه، جلوگیری از توسعه سیستم ریشه، ایجاد زردبرگی (کلروز) و بافت‌مردگی برگ، تخریب مولکول کلروفیل و کاهش فتوسنتز و تنفس گیاه می‌شود. اولین نشانه ایجاد خسارت اکسیداتیو در گیاهان، پراکسیداسیون لیپیدها است که در نتیجه آن انسجام غشای سلولی از بین رفته و به دنبال آن نفوذپذیری غشا افزایش می‌یابد (۶ و ۶۳). در حضور غلظت‌های زیاد فلزات سنگین، از جمله نیکل، پراکسیداسیون لیپیدها عامل مهم کاهش رشد گیاه می‌باشد (۶ و ۶۳).

سیستم دفاعی گیاه در مقابل خسارت اکسیداتیو حاصل از تنش‌های زیستی و غیرزیستی، شامل آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از جمله کاتالاز، سوپر اکسید دیسموتاز و انواع پراکسیدازها (جزیی از سیستم آنتی‌اکسیدان گلووتاتیون، GSH) و ترکیبات غیر آنزیمی از جمله گلووتاتیون، اسید آسکوربیک و ترکیبات فنلی می‌باشد (۴۵). ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجب حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن در گیاه می‌شود (۴۵ و ۶۸). تنش‌های مختلف باعث القای گونه‌های فعال اکسیژن در سلول‌های گیاهی می‌شوند. تغییرات دمایی، شوک مکانیکی، اشعه فرابنفش، قرار گرفتن در معرض اوزن، کمبود آب و فراوانی فلزات سنگین نمونه‌هایی از تنش‌های محیطی می‌باشد که باعث افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌شوند (۸). سمیت و کمبود نیکل هر دو از عوامل ایجاد تنش اکسیداتیو در گیاهان می‌باشند. در شرایط کمبود نیکل، انباشتگی متابولیت‌های سمی اوره و نترات در گیاه و در شرایط سمیت آن، انباشته شدن گونه‌های فعال

غلظت یک دوم و چهار روز پس از آن از محلول غذایی کامل برای آبیاری گلدان‌ها استفاده شد. آبیاری گلدان‌ها با محلول غذایی به‌طور روزانه و به مقداری که از گلدان‌ها زه‌کش نشود (۲۰ میلی‌لیتر) انجام شد. بوته‌های خیار در دو مرحله رشد، مرحله رشد رویشی (۵۵ روز پس از کشت بذرها، برداشت اول) و پس از گل‌دهی (۱۰۰ روز پس از کشت بذرها، برداشت دوم) برداشت شدند. در هر مرحله، پس از برداشت بوته‌ها، غلظت نیکل و مالون‌دی‌آلدئید و همچنین فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز شاخصه تعیین شد.

تعیین غلظت مالون‌دی‌آلدئید برگ

نمونه‌های برگ تازه گیاهی با استفاده از محلول ۲- تیوباربتوریک اسید (TBA) تهیه شده در تری‌کلرو استیک اسید (TCA) همگن و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس آنکوباسیون شدند. پس از سرد شدن، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰g سانتریفیوژ و میزان جذب محلول رویی در طول موج‌های ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر توسط دستگاه طیف‌سنج اندازه‌گیری شد. میزان پراکسیداسیون لیپیدها با تعیین مقدار مالون‌دی‌آلدئید (Malonedialdehyde, MDA) به وسیله آزمون TBA و با استفاده از ضریب تصحیح $1 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1} 155$ مشخص شد (۱۴).

استخراج آنزیمی

نمونه‌های برگ تازه گیاهی به وسیله بافر استخراج فسفات سدیم (۵۰ mM، pH=۷) حاوی Triton-x100 به مدت یک ساعت ساییده شد تا کاملاً همگن شود. سپس این مخلوط در دمای چهار درجه سلسیوس در دور ۱۵۰۰۰g سانتریفیوژ و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در عصاره رویی تعیین شد (۴۸).

سنجش‌های آنزیمی

فعالیت آنزیم کاتالاز با بررسی کاهش مقدار هیدروژن پراکسید

اکسیژن باعث ایجاد خسارت اکسیداتیو می‌شود. پاسخ آنتی‌اکسیدانی گیاه به سمیت و کمبود نیکل و خسارت اکسیداتیو ناشی از آن، نقش مهمی در تحمل متابولیک گیاه در برابر تنش دارد و این تحمل متابولیک در بین ارقام مختلف گیاهی متفاوت می‌باشد (۷). با توجه به کمبود اطلاعات در مورد اثرهای زیستی سطوح مختلف کمبود تا سمیت نیکل بر خسارت اکسیداتیو و همچنین پاسخ آنتی‌اکسیداتیو گیاه، پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر پاسخ آنتی‌اکسیداتیو دو رقم خیار (یک رقم گلخانه‌ای و یک رقم مزرعه‌ای) به غلظت‌های مختلف نیکل در محلول غذایی حاوی نیترات آمونیوم انجام شد.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر در محیط کشت هیدروپونیک با بستر شن، شسته شده و عاری از هرگونه آلودگی نیکل در گلخانه مرکز پژوهشی کشت بدون خاک دانشگاه صنعتی اصفهان اجرا شد. این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو تیمار شامل سطوح مختلف نیکل (صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار از منبع کلرید نیکل) و دو رقم خیار (*Cucumis sativus* L.) شامل رقم مزرعه‌ای سوپر دامینوس (*Super Dominus*) و رقم گلخانه‌ای نگین، در سه تکرار انجام شد. بذرها در دو رقم خیار (چهار عدد در هر گلدان) درون گلدان‌های پلی‌اتیلنی یک لیتری، حاوی شن استریل شده کشت شدند. بوته‌های خیار در شرایط محیطی کنترل شده گلخانه (بیشینه و کمینه دما به ترتیب ۳۰ و ۱۸ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵۰-۶۰ درصد و شدت نور ۵۰۰ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه) رشد کردند. گیاهچه‌ها به مدت دو هفته (تا مرحله دو برگگی) روزانه با آب مقطر آبیاری شدند. پس از دو هفته، از محلول غذایی جانسون (جدول ۱) با غلظت یک چهارم، همراه با سطوح مختلف نیکل، برای آبیاری استفاده شد. برای ساخت محلول‌های غذایی از آب دوبار تقطیر شده که غلظت نیکل آن کمتر از حد تشخیص دستگاه اتمی مجهز به کوره گرافیتی بود استفاده شد. در مرحله سه برگگی، از محلول غذایی جانسون با

جدول ۱. ترکیب محلول غذایی مورد استفاده در این آزمایش

غلظت (mM)	عناصر پرمصرف	غلظت (μM)	عناصر کم‌مصرف
۵	نیتрат آمونیوم	۵۰	سکوسترین آهن
۲/۵	سولفات پتاسیم	۳	سولفات منگنز
۰/۵	مونو فسفات پتاسیم	۲	سولفات روی
۰/۸	سولفات منیزیم	۱	سولفات مس
۲	کلرید کلسیم	۲۴	اسید بوریک
۳/۵	مجموع ترکیبات سولفات	۰/۱	مولیبدات سدیم

نتایج

غلظت نیکل برگ

در مرحله رشد رویشی، اثر کاربرد نیکل بر غلظت نیکل برگ، بسته به غلظت مورد استفاده و رقم خیار متفاوت بود (شکل ۱). در رقم سوپر دامینوس، کاربرد ۵۰ میکرومولار نیکل اثر معنی‌داری بر غلظت نیکل برگ در مقایسه با شاهد (تیمار بدون نیکل) نداشت؛ ولی غلظت‌های بیشتر آن سبب افزایش معنی‌دار (در سطح احتمال ۵٪) غلظت این عنصر در برگ شد. در رقم نگین، با افزایش غلظت نیکل محلول غذایی، غلظت این عنصر در برگ نیز زیاد شد. در هر دو رقم مورد مطالعه، بیشترین غلظت نیکل برگ در سطح ۲۰۰ میکرومولار این عنصر مشاهده شد. در مرحله پس از گل‌دهی، در هر دو رقم خیار مورد مطالعه، کاربرد نیکل در محیط کشت سبب افزایش معنی‌دار (در سطح احتمال ۵٪) غلظت نیکل برگ در مقایسه با شاهد شد (شکل ۱). به‌طوری‌که بیشترین غلظت آن در سطح ۲۰۰ میکرومولار نیکل مشاهده شد. اگرچه در رقم نگین، اختلاف معنی‌داری بین سطوح ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار نیکل از نظر غلظت نیکل برگ وجود نداشت.

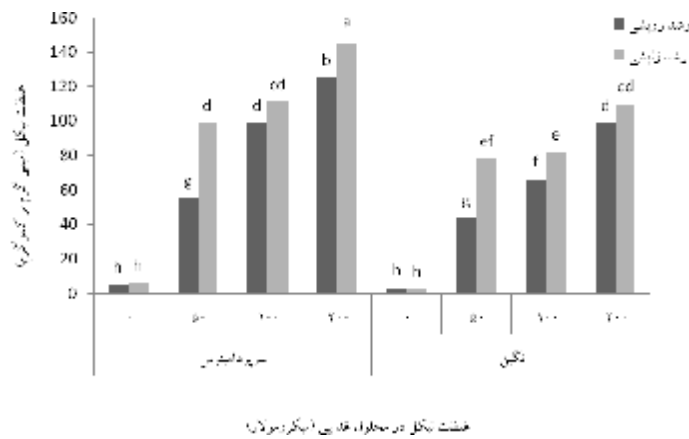
غلظت مالون‌دی‌آلدئید

اثر کاربرد نیکل بر مقدار پراکسیداسیون لیپیدها بسته به غلظت مورد استفاده این عنصر در محیط کشت و رقم خیار متفاوت

در حضور عصاره استخراج شده از گیاه تازه در طول موج ۲۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. به این منظور، عصاره استخراج شده همراه با بافر فسفات سدیم (۵۰ mM، pH=۷) و پراکسید هیدروژن مخلوط و میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در ترکیب حاصل توسط دستگاه طیف‌سنج در طول موج ۲۴۰ نانومتر تعیین شد (۴۸). فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX)، به‌عنوان نمونه‌ای از انواع پراکسیدازها مورد ارزیابی قرار گرفت. محیط واکنش شامل عصاره استخراجی، بافر فسفات سدیم (۵۰ mM، pH=۷)، هیدروژن پراکسید و گایاکول بود. فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز با افزایش جذب در طول موج ۴۷۰ nm به‌واسطه تشکیل تترا گایاکول به مدت ۷۰ ثانیه توسط دستگاه طیف‌سنج تعیین شد (۲۳). فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز مطابق روش کک مک و مارشور (۱۴) تعیین شد. مخلوط فرآیند شامل عصاره استخراجی، بافر فسفات سدیم (۵۰ mM، pH=۷)، EDTA، هیدروژن پراکسید و اسید آسکوربیک بود. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز با اندازه‌گیری کاهش جذب طول موج ۲۹۰ نانومتر توسط دستگاه طیف‌سنج تعیین شد.

غلظت نیکل گیاه

غلظت نیکل در نمونه‌های گیاهی با استفاده از دستگاه جذب اتمی مجهز به کوره گرافیتی اندازه‌گیری شد.



شکل ۱. تأثیر سطوح مختلف نیکل بر غلظت نیکل برگ دو رقم خیار مورد مطالعه در مراحل رشد رویشی و زایشی

رقم گیاه و سطح نیکل مصرفی، سبب کاهش معنی دار (در سطح احتمال ۵٪) فعالیت آنزیم کاتالاز برگ در مقایسه با شاهد شد. کمترین فعالیت آنزیم برگ در رقم سوپر دامینوس در سطح ۱۰۰ میکرومولار و در رقم نگین در سطح ۲۰۰ میکرومولار نیکل مشاهده شد.

فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز

تأثیر کاربرد نیکل بر فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز برگ، در مرحله رشد رویشی، بسته به غلظت مورد استفاده و رقم خیار متفاوت بود (شکل ۴). در هر دو رقم خیار مورد مطالعه، نیکل در غلظت ۵۰ میکرومولار سبب کاهش و در غلظت ۱۰۰ میکرومولار سبب افزایش معنی دار (در سطح احتمال ۵٪) فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز برگ در مقایسه با شاهد شد. در رقم سوپر دامینوس، افزایش سطح نیکل به ۲۰۰ میکرومولار موجب افزایش معنی دار فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز برگ شد؛ در حالی که در رقم نگین، تأثیر معنی داری بر فعالیت این آنزیم در مقایسه با شاهد نداشت. به طور کلی، در هر دو رقم خیار مورد مطالعه، کمترین فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در سطح ۵۰ میکرومولار نیکل مشاهده شد.

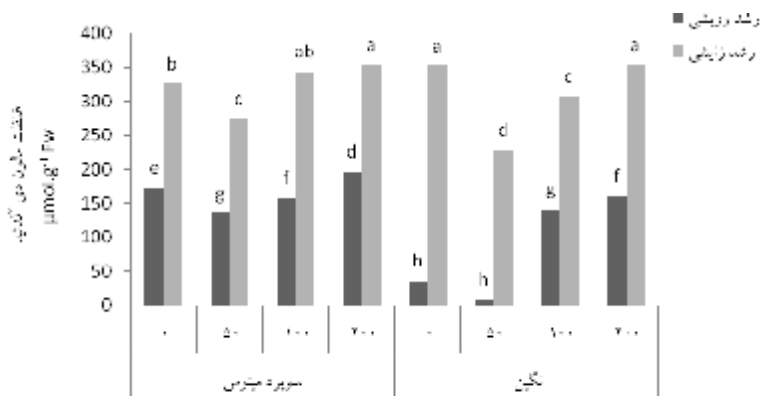
فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

تأثیر کاربرد نیکل بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز برگ،

بود (شکل ۲). در هر دو مرحله رشد گیاه، با کاربرد ۵۰ میکرومولار نیکل، پراکسیداسیون لیپیدها و در نتیجه تولید مالوندی آلدئید در برگ هر دو رقم خیار، کاهش یافت. در هر دو رقم خیار، کمترین غلظت مالوندی آلدئید برگ در سطح ۵۰ میکرومولار نیکل وجود داشت. تأثیر افزایش غلظت نیکل به ۱۰۰ میکرومولار بر غلظت مالوندی آلدئید بسته به رقم و مرحله رشد گیاه متفاوت بود. این سطح نیکل در مرحله رشد رویشی، موجب کاهش غلظت مالوندی آلدئید برگ رقم سوپر دامینوس و افزایش آن در رقم نگین شد. افزایش سطح نیکل به ۲۰۰ میکرومولار در محیط کشت در هر دو رقم خیار موجب افزایش غلظت مالوندی آلدئید شد.

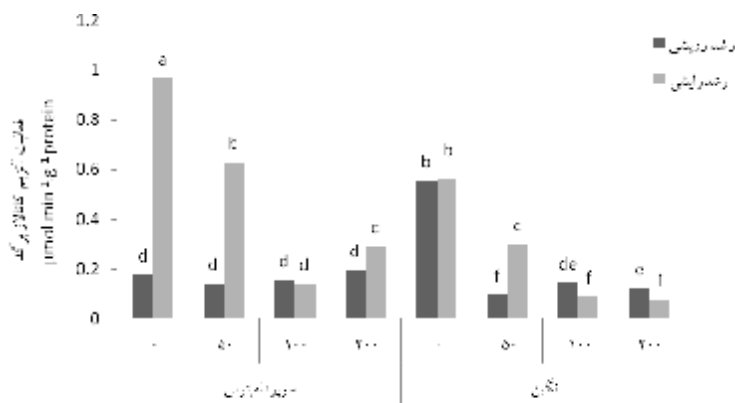
فعالیت آنزیم کاتالاز

تأثیر کاربرد نیکل بر فعالیت آنزیم کاتالاز برگ بسته به رقم خیار، مرحله رشد و غلظت مورد استفاده نیکل متفاوت بود (شکل ۳). در مرحله رشد رویشی، در رقم سوپر دامینوس، فعالیت آنزیم کاتالاز برگ تحت تأثیر سطوح مختلف نیکل قرار نگرفت. در حالی که در رقم نگین، کاربرد هر سه سطح نیکل در محیط کشت، سبب کاهش معنی دار (در سطح احتمال ۵٪) فعالیت آنزیم کاتالاز برگ در مقایسه با شاهد شد و کمترین فعالیت این آنزیم نیز در سطح ۵۰ میکرومولار نیکل وجود داشت. در مرحله پس از گل دهی، کاربرد نیکل، صرف نظر از



غلظت نیکل محلول در برگ (میکرومول در گرم)

شکل ۲. تأثیر سطوح مختلف نیکل بر غلظت مالون‌دی‌آلدئید برگ دو رقم خیار مورد مطالعه در مراحل رشد رویشی و زایشی



فعالیت کاتالاز در برگ (میکرومول در دقیقه در گرم پروتئین)

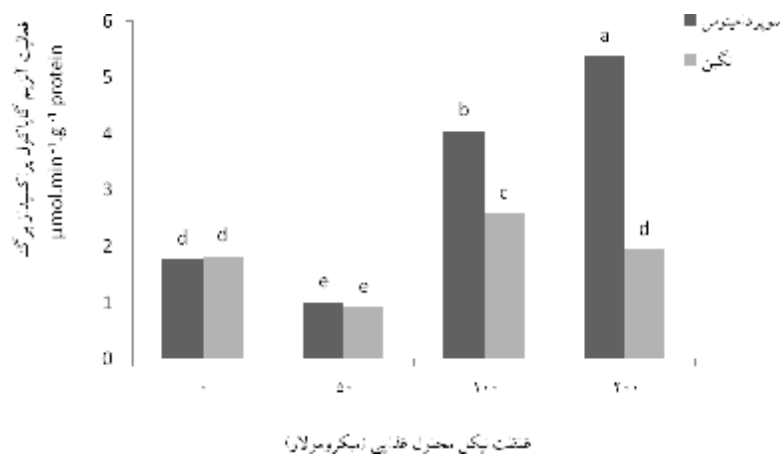
شکل ۳. تأثیر سطوح مختلف نیکل بر فعالیت آنزیم کاتالاز برگ دو رقم خیار مورد مطالعه در مراحل رشد رویشی و زایشی

پراکسیداز برگ در مقایسه با شاهد شد. به طوری که بیشترین فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز برگ مشابه رقم سوپر دامینوس در سطح ۵۰ میکرومولار نیکل و کمترین فعالیت این آنزیم در شاهد مشاهده شد.

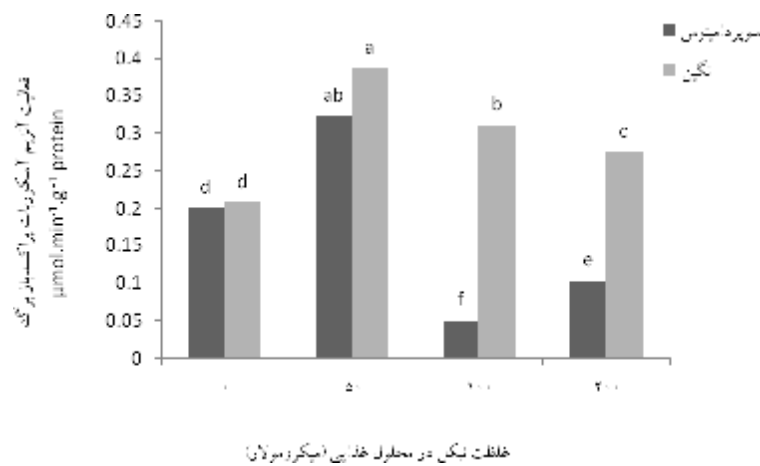
بحث

غلظت نیکل برگ بسته به غلظت این عنصر در محیط کشت، رقم خیار و مرحله رشد گیاه متفاوت بود. نتایج نشان داد که غلظت نیکل برگ در هر دو رقم خیار با افزایش غلظت این عنصر در محیط کشت و مدت زمان کاربرد آن، افزایش یافت.

در مرحله پس از گل‌دهی، بسته به غلظت این عنصر در محیط کشت و رقم خیار متفاوت بود (شکل ۵). در رقم سوپر دامینوس، کاربرد ۵۰ میکرومولار نیکل سبب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم کاتالاز برگ در مقایسه با شاهد گردید. در حالی که افزایش غلظت نیکل به ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار موجب کاهش معنی‌دار فعالیت این آنزیم در مقایسه با شاهد شد. بیشترین فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز برگ رقم سوپر دامینوس در سطح ۵۰ میکرومولار و کمترین آن در سطح ۱۰۰ میکرومولار نیکل مشاهده شد. در رقم نگین، کاربرد هر سه سطح نیکل در محیط کشت، سبب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم آسکوربات



شکل ۴. تأثیر سطوح مختلف نیکل بر فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز برگ دو رقم خیار مورد مطالعه در مرحله رشد رویشی



شکل ۵. تأثیر سطوح مختلف نیکل بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز برگ دو رقم خیار مورد مطالعه در مرحله پس از گل دهی

نشان داده شده که جذب نیکل توسط گیاهان به غلظت این عنصر (۱۳)، گونه گیاه، مرحله رشد، اندام گیاهی (۲۵)، متابولیسم گیاه (۵)، پ- هاش خاک یا محلول غذایی (۲، ۳۲ و ۳۹)، حضور سایر فلزات (۳۴، ۳۸ و ۴۹) و ترکیب مواد آلی (۱۱ و ۲۹) بستگی دارد.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که کاربرد ۵۰ میکرومولار نیکل در محیط کشت در هر دو رقم خیار و در هر دو مرحله برداشت موجب کاهش غلظت مالوندی آلدهید برگ در مقایسه با شاهد شد. نیکل به عنوان بخشی از آنزیم اوره آز، نقش مهمی در متابولیسم اوره و آرژنین، که هر دو از متابولیت‌های معمول

به‌طوری‌که بیشترین غلظت نیکل برگ در هر دو مرحله نمونه‌برداری در سطح ۲۰۰ میکرومولار نیکل مشاهده شد و با گذشت زمان در مرحله پس از گل‌دهی نیز به بیشترین مقدار خود افزایش یافت. به‌طور کلی، رقم سوپر دامینوس در مقایسه با رقم نگین مقدار بیشتری نیکل در بوته‌های خود انباشته کرد. نیکل معمولاً به راحتی توسط گیاهان جذب می‌شود و سرعت جذب آن به غلظت نیکل در محیط کشت بستگی دارد (۴۳). جذب این عنصر توسط ریشه گیاه از خاک به‌طور عمده از طریق پخشیدگی غیرفعال و به مقدار کمتری از طریق انتقال فعال صورت می‌گیرد (۵۳). مشابه نتایج حاصل از این پژوهش

و مهم گیاه هستند، ایفا می‌کند (۲۵). در هر دو رقم خیار و هر دو مرحله برداشت، کمترین غلظت مالون‌دی‌آلدئید در مقایسه با شاهد (تیمار بدون نیکل) در سطح ۵۰ میکرومولار نیکل وجود داشت که نشان می‌دهد نیکل با تأثیر مثبت خود بر متابولیسم نیتروژن در گیاه موجب کاهش انباشتگی اوره درون‌زا و نیترات در گیاه شده و در نتیجه پراکسیداسیون غشای سلولی و غلظت مالون‌دی‌آلدئید تولیدی را در مقایسه با شاهد کاهش داده است. به‌علاوه، کمبود نیکل (سطح صفر) نیز باعث ایجاد تنش اکسیداتیو و افزایش گونه‌های آزاد اکسیژن در گیاه شده که کاربرد ۵۰ میکرومولار نیکل موجب بهبود شرایط تنش ایجاد شده بر اثر کمبود این عنصر و کاهش غلظت مالون‌دی‌آلدئید گردید. یکی از نشانه‌های پراکسیداسیون لیپیدهای غشا، تشکیل مالون‌دی‌آلدئید می‌باشد که یکی از محصولات حاصل از تجزیه اسیدهای چرب اشباع نشده به حساب می‌آید (۴۰ و ۴۱).

کاربرد غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار نیکل در محیط کشت بسته به رقم، موجب افزایش غلظت مالون‌دی‌آلدئید برگ گیاه شد. عنصر نیکل به‌عنوان یک فلز سنگین در غلظت‌های زیاد، سمی است. سمیت نیکل می‌تواند اثرهای زیانباری بر رشد گیاه و متابولیسم نیتروژن داشته باشد و با افزایش و انباشتگی گونه‌های فعال اکسیژن از جمله رادیکال سوپر اکسید (O_2^-) و گونه پراکسید هیدروژن (H_2O_2) سبب ایجاد خسارت اکسیداتیو در گیاه شود (۲۴، ۳۶ و ۵۳). پراکسیداسیون لیپیدهای غشای اولین نشانه‌های سمیت نیکل در گیاه است که با تغییر ساختار غشای سلول‌ها سبب بازدارندگی رشد گیاه می‌شود (۴۶). افزایش پراکسیداسیون لیپیدها و غلظت گونه‌های فعال اکسیژن در بسیاری از گونه‌های گیاهی در حضور غلظت‌های زیاد فلزات سنگین از جمله مس، سرب، روی، کادمیم و نیکل گزارش شده است (۲۴، ۵۲ و ۶۰).

اثر کاربرد غلظت‌های مختلف نیکل بر پراکسیداسیون لیپید با گذشت زمان و اعمال تیمار نیکل متفاوت بود. به‌طوری‌که در مرحله پس از گل‌دهی، غلظت مالون‌دی‌آلدئید تولید شده بیشتر از برداشت اول (مرحله رویشی) بود که به‌دلیل انباشتگی بیشتر

نیکل در برداشت دوم و تولید و انباشتگی گونه‌های فعال اکسیژن در اثر سمیت نیکل است. مطابق یافته‌های سایر پژوهشگران، پاسخ گیاه به سمیت نیکل بسته به گونه گیاهی، مرحله رشد، غلظت نیکل و مدت زمان اعمال تیمار نیکل متفاوت می‌باشد (۳۷). در همین راستا، ماهشواری و دویی (۳۶) نیز نشان دادند که با گذشت زمان، غلظت مالون‌دی‌آلدئید حاصل از پراکسیداسیون لیپیدها در حضور غلظت‌های زیاد نیکل افزایش یافت. حد بحرانی سمیت نیکل در گیاه، بسته به رقم و مرحله برداشت متفاوت بود. به‌طوری‌که در مرحله اول برداشت، حد بحرانی سمیت نیکل در رقم سوپر دامینوس بیشتر از رقم نگین بوده، اما در مرحله دوم برداشت، حد سمیت این عنصر در رقم نگین بیشتر از رقم سوپر دامینوس بود. افزایش پراکسیداسیون لیپیدها و غلظت گونه‌های فعال اکسیژن در بسیاری از گونه‌های گیاهی در حضور غلظت‌های سمی فلزات سنگین از جمله مس، سرب، روی، کادمیم و نیکل گزارش شده است (۲۴، ۵۲ و ۶۰). گیاهان در مواجهه با تنش اکسیداتیو، دارای سازوکارهای دفاعی متعددی بوده که تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نظیر کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز از جمله آن می‌باشد. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو در شرایط تنش متفاوت بوده و کاهش یا افزایش یافته و یا بدون تغییر باقی می‌ماند.

نتایج نشان داد که تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان اندازه‌گیری شده در این پژوهش بر اثر تنش کمبود و یا سمیت نیکل، بسته به غلظت این عنصر در محیط، رقم و مرحله رشد گیاه متفاوت بود. ژانگ و همکاران (۶۱) نیز گزارش کردند که در غلظت‌های زیاد فلزات سنگین، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌تواند افزایش یا کاهش یافته و یا بدون تغییر باقی بماند. روند تغییر فعالیت هر یک از این آنزیم‌ها با نوع عنصر ایجادکننده تنش، غلظت عنصر در محیط کشت، آنزیم مورد آزمایش، رقم و اندام گیاهی مورد مطالعه متفاوت است (۱۹، ۵۶ و ۵۸). نتایج آزمایش حاضر نشان داد که فعالیت آنزیم کاتالاز بسته به غلظت نیکل، رقم خیار و مرحله برداشت

غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار نیکل با ایجاد تنش اکسیداتیو ناشی از سمیت این عنصر، موجب افزایش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز جهت حذف رادیکال‌های آزاد و تعدیل شرایط تنش شد. مشابه نتایج به‌دست آمده، پژوهش ماهشواری و دویی (۳۶) نیز نشان دادند که در سطوح ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار نیکل، فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز افزایش یافت. افزایش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در شرایط تنش ناشی از شوری (۳۰) و حضور فلزات سنگین نظیر سرب، کادمیم، منگنز و آلومینیوم نیز گزارش شده است (۵۴ و ۶۰).

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که کاربرد ۵۰ میکرومولار نیکل در هر دو رقم مورد مطالعه سبب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در مقایسه با شاهد شد. افزایش سطح نیکل به ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار در رقم سوپر دامینوس و به ۲۰۰ میکرومولار در رقم نگین، موجب کاهش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در اثر تنش اکسیداتیو ناشی از سمیت این عنصر شد. به نظر می‌رسد آنزیم آسکوربات پراکسیداز برای از بین بردن گونه پراکسید هیدروژن تولید شده در اثر انباشتگی متابولیت‌های سمی اوره و نیترات درون گیاه در شرایط کمبود نیکل (سطح صفر) و یا در اثر سمیت این عنصر دارای نقش نمی‌باشد. به‌طوری‌که در سطح ۵۰ میکرومولار نیکل که شرایط تنش بهبود یافته، فعالیت این آنزیم افزایش یافته و در ادامه فعالیت آن در اثر شرایط تنش ناشی از سمیت دوباره کاهش یافته است. در همین راستا، گومس جونیور و همکاران (۲۷) نیز نشان دادند که کاربرد ۵۰ میکرومولار نیکل در سویا موجب افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در مقایسه با شاهد (تیمار بدون نیکل) شد؛ درحالی‌که با افزایش سطح نیکل به ۵۰۰ میکرومولار، فعالیت این آنزیم کاهش یافت. باکوچ و همکاران (۶) نیز افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز ریشه و برگ ذرت در اثر کاربرد نیکل را گزارش کردند. دومان و اتورک (۲۱) نشان دادند که فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز تره شاهی در اثر کاربرد ۱ میلی‌گرم در لیتر نیکل در محیط کشت افزایش یافت. درحالی‌که افزایش غلظت نیکل، موجب کاهش فعالیت این آنزیم

متفاوت بود. در برداشت اول، فعالیت آنزیم کاتالاز برگ در رقم سوپر دامینوس تحت تأثیر کاربرد نیکل قرار نگرفت. به‌طوری‌که اختلاف معنی‌داری بین سطوح مختلف نیکل و شاهد از نظر فعالیت این آنزیم وجود نداشت. در رقم نگین، کاربرد ۵۰ میکرومولار نیکل سبب کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز شد که به نظر می‌رسد کاهش خسارت ناشی از کمبود نیکل و بهبود متابولیسم اوره و نیترات در گیاه، موجب کاهش رادیکال‌های آزاد اکسیژن و در نتیجه کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز شده است. افزایش سطح نیکل به ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار باعث ایجاد تنش اکسیداتیو ناشی از سمیت این عنصر در گیاه شده و فعالیت آنزیم کاتالاز جهت از بین بردن رادیکال‌های آزاد ایجاد شده و تعدیل شرایط تنش افزایش یافت. در برداشت دوم، در هر دو رقم خیار مورد مطالعه، فعالیت آنزیم کاتالاز در اثر کاربرد نیکل کاهش یافت. یان و همکاران (۶۴) نیز افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز در شرایط سمیت نیکل را گزارش کردند. در مقابل، مادهاوا راثو و اسرستی (۳۵) نشان دادند که فعالیت آنزیم کاتالاز در سطوح بالای نیکل در گیاه نخود فرنگی کاهش یافت. در هر صورت، افزایش یا کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز بر اثر تنش کمبود نیکل به دلیل انباشتگی بیش از حد اوره و نیترات در گیاه و یا سمیت نیکل، می‌تواند بخشی از سازوکار دفاعی گیاه در مقابل خسارت اکسیداتیو ایجاد شده باشد.

آنزیم گایاکول پراکسیداز از دیگر آنزیم‌های مهم از بین برنده پراکسید هیدروژن در گیاهان می‌باشد که به‌عنوان شاخص زیستی جهت بررسی خسارت وارده ناشی از تنش غلظت‌های سمی فلزات سنگین مختلف، استفاده می‌شود (۵۱). نتایج نشان داد که در هر دو رقم مورد مطالعه، فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در اثر کاربرد ۵۰ میکرومولار نیکل کاهش یافت. این نتیجه نشان می‌دهد کاربرد ۵۰ میکرومولار نیکل با بهبود متابولیسم نیتروژن موجب کاهش انباشتگی متابولیت‌های سمی اوره و نیترات در گیاه شده و در نتیجه فعالیت این آنزیم آنتی‌اکسیدانی کاهش یافته است. همچنان که غلظت مالون‌دی‌آلدئید تولید شده در اثر پراکسیداسیون غشا نیز در این سطح نیکل کاهش یافت.

گیاه متفاوت بود. از سوی دیگر، پاسخ آنتی‌اکسیداتیو گیاه به کمبود و سمیت نیکل بسته به رقم، غلظت نیکل، مرحله رشد گیاه و نوع آنزیم متفاوت بود. به‌طور کلی، در هر دو رقم، آنزیم گایاکول پراکسیداز جهت از بین بردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن تولید شده در شرایط تنش کمبود و سمیت نیکل فعال‌تر بود و با افزایش فعالیت خود نقش مهمی در تعدیل شرایط تنش ایفا کرد. کاهش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در هر دو رقم مورد مطالعه در حضور غلظت‌های بیشتر نیکل، نشان‌دهنده غیرفعال بودن این آنزیم برای تخریب گونه پراکسید هیدروژن است. آنزیم کاتالاز نیز تنها در رقم نگین و در برداشت اول نقش مؤثری در کاهش تنش اکسیداتیو ایجاد شده در اثر کمبود و سمیت نیکل داشت و فعالیت آن در رقم سوپر دامینوس در مرحله اول برداشت تحت تأثیر کاربرد نیکل قرار نگرفت و در مرحله دوم برداشت، در هر دو رقم، در کاهش تنش اکسیداتیو ایجاد شده غیرفعال بود.

در گیاه شد. در مقابل، نتایج پژوهش گاجوسکا و اسکلودووسکا (۲۴) روی گندم نشان داد فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در حضور غلظت‌های بالای نیکل (۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار) در گیاه افزایش یافت. هم‌چنین ماهشواری و دبی (۳۶) در مطالعه خود روی گیاه برنج نشان دادند که با افزایش غلظت نیکل و مدت زمان تیمار، فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز افزایش یافت.

نتیجه‌گیری

تأثیر کاربرد نیکل بر پاسخ آنتی‌اکسیداتیو خیار بسته به غلظت نیکل، رقم و مرحله رشد گیاه متفاوت بود. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که کاربرد ۵۰ میکرومولار نیکل در هر دو مرحله برداشت گیاه با بهبود متابولیسم نیتروژن موجب کاهش غلظت مالون‌دی‌آلدئید ناشی از پراکسیداسیون غشا گردید. کاربرد غلظت‌های بیشتر نیکل موجب سمیت این عنصر در ارقام مورد مطالعه شد که حد بحرانی سمیت آن بسته به رقم و مرحله رشد

منابع مورد استفاده

- Ahmad, M. S. A., M. Hussain, M. Ashraf, R. Ahmad and M. Y. Ashraf. 2009. Effect of nickel on seed germinability of some elite sunflower (*Helianthus annuus* L.). Pakistan J. Bot. 41: 1871-1882.
- Albrecht, S. L., R. J. Maier, F. J. Hanus, S. A. Russel, D. W. Emerich and H. J. Evans. 1979. Hydrogenase in rhizobium japonicum increase nitrogen fixation by nodulated soybeans. Sci. 203: 1255-1257.
- Ali, M. A., M. Ashraf and H. R. Athar. 2009. Influence of nickel stress on growth and some important physiological/biochemical attributes in some diverse canola (*Brassica napus* L.) cultivars. J. Hazard. Mater. 172: 964-969.
- Antoniadis, V., J. S. Robinson and B. J. Alloway. 2008. Effects of short-term pH fluctuations on cadmium, nickel, lead, and zinc availability to ryegrass in a sewage sludge-amended field. Chemosphere 71: 759-764.
- Apel, K. and H. Hirt. 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annu. Rev. Plant Biol. 55: 373-399.
- Asada. K. 1999. The water cycle in chloroplast: Scavenging of oxygens and dissipation of excess photons. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 50: 601-639.
- Aschmann, S. G. and R. J. Zasoski. 1987. Nickel and rubidium uptake by whole oat plant in solution culture. Physiol. Plant 71: 191-196.
- Baccouch, S., A. Chaoui and E. El Ferjani. 2001. Ni toxicity induced oxidative damage in *Zea mays* roots. J. Plant Nutr. 24: 1085-1097.
- Barker, A. V. and D. J. Pilbeam. 2007. Nickel. PP. 395-406. In: Barker, A. V. and D. J. Pilbeam. (Eds.), Handbook of Plant Nutrition, Taylor and Francis Group, New York.
- Bhatia, N. P., K. B. Walsh, I. Orlic, R. Siegele, N. Ashwath and A. J. M. Baker. 2004. Studies on spatial distribution of nickel in leaves and stems of the metal hyperaccumulator *Stackhousia tryonii* Bailey using nuclear microprobe (micro-PIXE) and EDXS techniques. Funct. Plant Biol. 31: 1061-1074.
- Brown, P. H., R. M. Welch and E. E. Cary. 1987. Nickel: A micronutrient essential for higher plants. Plant Physiol. 85: 801-803.
- Buege, J. A. and S. D. Aust. 1987. Microsomal lipid peroxidation. Methods Enzymol. 52: 302-310.
- Burke, S. C., J. S. Angle, R. L. Chaney and S. D. Cunningham. 2000. Arbuscular mycorrhizae effects on heavy metal uptake by corn. Intl. J. Phytol. 2: 23-29.

14. Cakmak, I. and Marschner, H. 1992. Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase in bean leaves. *Plant Physiol.* 98:1222-1227.
15. Cammack, R. 1995. Splitting molecular hydrogen. *Nature* 373: 556-557.
16. Cataldo, D. A., T. R. Garland and W. I. Ldung. 1978. Nickel in plants. I. Uptake kinetics using intact soybean seedlings. *Plant Physiol.* 62: 563-565.
17. Chaparzadeh, N., M. L. D'Amico, R. A. Khavari-Nejad, R. Izzo and F. Navari-Izzo. 2004. Antioxidative responses of *Calendula officinalis* under salinity conditions. *Plant Physiol. Biochem.* 42: 695-701.
18. Chen, C. and Y. Lin. 2003. Nickel-induced oxidative stress and effect of antioxidant in human lymphocytes. *Arch. Toxicol.* 77: 123-130.
19. Dalton, A. D., S. A. Russel and H. J. Evans. 1988. Nickel as a micronutrient element for plants. *Biofactors* 1(1): 11-14.
20. Dat, J., S. Vandenamee, E. V. Vranova, M. Montagu, D. V. Inze and F. Breusegem. 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol. Life Sci.* 57: 779-795.
21. Demirevska-Kepova, K., L. Simova-Stoilova, Z. Stoyanova, R. Holzer and U. Feller. 2004. Biochemical changes in barley plants after excessive supply of copper and manganese. *Environ. Exp. Bot.* 52: 253-266.
22. Devi, S. R. and M. N. V. Prasad. 1998. Copper toxicity in *ceratophyllum demersum* L. (Coontail), a free floating macrophyte: Response of antioxidant enzymes and antioxidants. *Plant Sci.* 13: 157-165.
23. Dixon, N. E., C. Gazzola, R. L. Blakeley and B. Zermer. 1975. Jack bean urease (EC 3.5.1.5). A metalloenzyme. A simple biological role for nickel. *J. Am. Chem. Soc.* 97: 4131-4133.
24. Duman, F. and F. Oturk. 2009. Nickel accumulation and its effect on biomass, protein content and antioxidative enzymes in roots and leaves of watercress. *J. Environ. Sci.* 24: 526-532.
25. Fecht-Christoffers, M. M., P. Maier and W. J. Horst. 2003. Apoplastic peroxidase and ascorbate are involved in manganese toxicity and tolerance of *Vigna unguiculata*. *Physiol. Plant.* 117: 237-244.
26. Fielding, J. L. and J. Hall. 1978. A biochemical and cytochemical study of peroxidase activity in roots of *Pinus sativum*. *J. Exp. Bot.* 29: 989-981.
27. Gajewska, E. and M. Sklodowska. 2008. Differential biochemical responses of wheat shoots and roots to nickel stress: Antioxidative reactions and proline accumulation. *Plant Growth Regul.* 54: 179-188.
28. Gerendas, J. and B. Sattelmacher. 1999. Influence of Ni supply on growth and nitrogen metabolism of *Brassica napus* L. growth with NH_4NO_3 or urea as N source. *Ann. Bot.* 83: 65-71.
29. Gheibi, M. N., M. J. Malakouti, B. Kholdebarin, F. Ghanati, S. Teimouri and R. Sayadi. 2009. Significance of nickel supply for growth and chlorophyll content of wheat supplied with urea or ammonium nitrate. *J. Plant Nutr.* 32: 1440-1450.
30. Gomes-Junior, R. A., C. A. Moldes, F. S. Delite, P. L. Gratao, P. Mazzafera, P. J. Lea and R. A. Azedevo. 2006. Nickel elicits a fast antioxidant response in *Coffea arabica* cells. *Plant Physiol. Biochem.* 44: 420-429.
31. Hansch, R. and R. R. Mendel. 2009. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Current Opinion in Plant Biol.* 12: 259-266.
32. Jean, L., F. Bordas, C. Gautier-Moussard, P. Vernay, A. Hitmi and J. C. Bollinger. 2008. Effect of citric acid and EDTA on chromium and nickel uptake and translocation by *Datura innoxia*. *Environ. Pollut.* 153: 555-563.
33. Kim, S. Y., J. H. Lim, M. R. Park, Y. J. Kim, T. I. I. Park, Y. W. Seo, K. G. Choi and S. J. Yun. 2005. Enhanced antioxidant enzymes are associated with reduced hydrogen peroxide in barley roots under saline stress. *J. Biochem. Mol. Biol.* 38(2): 218-224.
34. Klucas, R. V., F. J. Hanus, S. A. Russell and H. J. Evans. 1983. Nickel: A micronutrient for hydrogen dependent growth of *Rhizobium japonicum* and for expression of urease activity in soybean leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 2253-2257.
35. Kukier, U. and R. L. Chaney. 2004. In situ remediation of nickel phytotoxicity for different plant species. *J. Plant Nutr.* 27: 465-495.
36. Kumar, P., R. K. Tewari and P. N. Sharma. 2007. Excess nickel-induced changes in antioxidative processes in maize leaves. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 170: 796-802.
37. Leon, V., J. Rabier, R. Notonier, R. Barthelemy, X. Moreau, S. Bouraima-Madjebi, J. Viano and R. Pineau. 2005. Effect of three nickel salts on germinating seed of *Grevillea exul* var. *rubiginosa*, an endemic serpentine Proteaceae. *Ann. Bot.* 95: 609-618.
38. Lou, H. Y., Z. X. Yue and J. Zhou. 2000. Synthesis and high-frequency magnetic properties of sol-gel derived Ni-Zn ferrite-forsterite composites. *J. Magn. Mater.* 210: 104-108.
39. Madhava Rao, K. V. and T. V. Sresty. 2000. Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* L.) in response to Zn and Ni stresses. *Plant Sci.* 157: 113-128.
40. Maheshwari, R. and R. S. Dubey. 2009. Nickel-induced oxidative stress and the role of antioxidant defence in rice seedlings. *Plant Growth Regul.* 59: 37-49.

41. Marschner, H. 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. 2nd ed., Academic Press, London, 889 p.
42. McKenna, H., R. Richey, S. Keeney, F. Hasson, B. Poulton and M. Sinclair. 2008. The managerial and development issues of nurses and midwives in new roles. *Scand. J. Caring Sci.* 22: 227.
43. McIlveen, W. D. and J. J. Negusanti. 1994. Nickel in the terrestrial environment. *Sci. Total Environ.* 148: 109-138.
44. Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7: 405-410.
45. Molassiotis, A., T. Satipoulos, G. Tanou, G. Diamantidis and I. Therios. 2005. Boron –induced oxidative damage and antioxidant and uncoupled responses in shoot tips culture of apple rootstock EM9 (*Malus domestica* Borkh.). *Environ. Exp. Bot.* 56: 54-62.
46. Molas, J. 1997. Changes in morphological and anatomical structure of cabbage outer leaves and in ultrastructure of their chloroplasts caused by an in vitro excess of nickel. *Photosyn.* 34: 513-522.
47. Morrison, R., R. Brooks and R. Reeves. 1980. Nickel uptake by *Allysum* species. *Plant Sci. Lett.* 17: 451-460.
48. Nicoulaud, B. A. L. and A. J. Bloom. 1998. Nickel supplements improve growth when foliar urea is the sole nitrogen source for tomato. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 123: 556-559.
49. Noctor, G. and C. H. Foyer. 1998. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 249-279.
50. Panda, S. K., I. Chaudhury and M. H. Khan. 2003. Heavy metals induce lipid peroxidation and affect antioxidants in wheat leaves. *Biol. Plant* 46: 289-294.
51. Parida, B. K., I. M. Chhibba and V. K. Nayyar. 2003. Influence of nickel contaminated soils on fenugreek growth and mineral composition. *Sci. Hort.* 98: 113-119.
52. Pereira, G. J. G., S. M. G. Molina, P. J. Lea and R. A. Azevedo. 2003. Activity of antioxidant enzymes in response to cadmium in *Crotalaria juncea*. *Plant Soil* 239: 123-132.
53. Pillay, S. V., V. S. Rao and K. V. N Rao. 1996. Nickel toxicity in *Hyptis suaveolens* (L). POIT. and *Helianthus annuus* L. *Ind. J. Plant Physiol.* 1(3): 153-156.
54. Podar, D., M. H. Ramsey and M. J. Hutchings. 2004. Effect of cadmium, zinc and substrate heterogeneity on yield, shoot metal concentration and metal uptake by *Brassica juncea*: Implications for human health risk assessment and phytoremediation. *New Phytol.* 163: 313-324.
55. Polaco, J. C. 1977. Is nickel a universal component of plant urease? *Plant Sci. Lett.* 10: 249-255.
56. Radotic, K., T. Ducic and D. Mutavdzic. 2000. Changes in peroxidase activity and isoenzymes in spruce needles after exposure to different concentrations of cadmium. *Environ. Exp. Bot.* 44: 105-113.
57. Seregin, I. V. and A. D. Kozhevnikova. 2006. Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. *Russ. J. Plant Physiol.* 53: 257-277.
58. Sharma, P. and R. S. Dubey. 2007. Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedling exposed to toxic concentration of aluminum. *Plant Cell Rep.* 26: 2027-2038.
59. Sheoran, I., S. Singal, H. R. and R. Singh. 1990. Effect of cadmium and nickel on photosynthesis and the enzymes of the photosynthetic carbon-reduction cycle in pigeonpea. *Photosyn. Res.* 23: 345-351.
60. Shri, M., S. Kumar, D. Chakrabarty, P. K. Trivedi, S. Mallic and P. Misra. 2009. Effect of arsenic on growth, oxidative stress, and antioxidant system in rice seedlings. *Ecotoxicol. Environ. Safe* 72: 1102-1110.
61. Song-tao, W., H. Xiao-Jia and A. Rui-dong. 2010. Responses of growth and antioxidant-metabolism to nickel toxicity in *Luffa cylindrica* seedlings. *J. Anim. Plant Sci.* 2: 810-821.
62. Srivastava, S., S. Mishra, R. D. Tripathi, S. Dwivedi and D. K. Gupta. 2006. Copper-induced oxidative stress and responses of antioxidants and phytochelatin in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle. *Aquat. Toxicol.* 8: 405-415.
63. Tiwari, R. K., P. Kumar, P. N. Sharma and S. S. Bisht. Modulation of oxidative stress responsive enzymes by excess cobalt. *Plant Sci.* 162: 381-388.
64. Ushimaru, T., S. Kanematsu, M. Shibasaki and H. Tsuji. 1999. Effect of hypoxia on antioxidant enzymes in aerobically grown rice (*Oryza sativa*) seedling. *Physiol. Plant* 107: 181-187.
65. Uthus, E. O. and C. D. Sesborn. 1996. Deliberation and evaluations of the approaches, endpoints and paradigms for recommendation of the other trace element. *J. Plant Nutr.* 126: 2452-2459.
66. Verma, S. and R. S. Dubey. 2003. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Sci.* 164: 645-655.
67. Willekens, H., M. M. Inzea and C. W. Van. 1995. Catalases in plants. *Mol. Breed.* 1: 207-228.
68. Wu, F., G. Zhang and P. Dominy. 2003. Four barley genotypes respond differently to cadmium: Lipid peroxidation and activities of antioxidant capacity. *Environ. Exp. Bot.* 50: 67-78.
69. Yan, R., S. Gao, W. Yang, M. Cao, S. Wang and F. Chen. 2008. Nickel toxicity induced antioxidant enzyme and phenylalanine ammonia-lyase activities in *Jatropha curcas* L. cotyledons. *Plant Soil Environ.* 54: 294-300.
70. Zhang, F. Q., Y. S. Wang, Z. P. Lou and J. D. Dong. 2007. Effect of heavy metal stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two mangrove plant seedling. *Chemosphere* 67: 44-50.