

## اثر غلظت‌های مختلف نیکل در محیط کشت بر رشد گیاه، انباشتگی نیکل و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در برخی گونه‌های *Pistacia*

سید مجید قادریان\* و نجمه پاکدامن

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۸/۰۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۲/۱۰)

### چکیده:

خاک‌های سرپتین دارای غلظت‌های زیاد و سمی فلزات سنگین نظیر نیکل، کروم و کبالت می‌باشند. گروهی از گیاهان، مانند گونه *Pistacia atlantica*، با کسب سازش‌های خاص قادرند در این خاک‌ها رشد کنند. در تحقیق حاضر، رشد، انباشتگی نیکل و فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گونه‌های سرپتین *P. atlantica* و غیرسرپتین *P. vera* و *P. khinjuk* در پاسخ به افزایش غلظت نیکل در محیط کشت بررسی گردید. نتایج مربوط به تأثیر افزایش غلظت نیکل بر وزن خشک گیاهان، نشان دهنده تحمل بیشتر گونه سرپتین *P. atlantica* در مقایسه با گونه‌های غیر سرپتین *P. vera* و *P. khinjuk* بود. گونه‌های سرپتین و غیرسرپتین *Pistacia* با توجه به غلظت بیشتر نیکل در بخش‌های هوایی نسبت به ریشه‌ای جزء گیاهان سد کننده محسوب می‌شوند که با تجمع نیکل در ریشه‌ها، از انتقال آن به بخش هوایی تا حدودی جلوگیری می‌کنند. در این تحقیق، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در بخش‌های هوایی و ریشه‌ای گونه‌های سرپتین و غیرسرپتین *Pistacia* با افزایش غلظت نیکل در محیط افزایش یافت. فعالیت این آنزیم‌ها، احتمالاً به منظور حفظ سامانه فتوستزی در برابر تنفس اکسیداتیو حاصل از غلظت‌های زیاد نیکل، در بخش‌های هوایی به مراتب بیشتر از بخش‌های ریشه‌ای بود. افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در بخش‌های هوایی گونه سرپتین *P. atlantica* در پاسخ به افزایش غلظت نیکل محیط، به طور متمایز بیش از گونه‌های غیرسرپتین بود. بنابراین فعالیت این آنزیم ممکن است به عنوان یکی از عوامل مؤثر در افزایش تحمل گونه سرپتین، در مقایسه با گونه‌های غیر سرپتین، نسبت به افزایش غلظت نیکل محیط باشد.

واژه‌های کلیدی: آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز، نیکل، *Pistacia vera*, *Pistacia khinjuk*, *Pistacia atlantica*

### مقدمه:

عناصر ضروری مانند نیتروژن (N) و فسفر (P) و همچنین مقادیر زیاد فلزات سنگین اشاره کرد (Proctor, 1999; Carranza-Alvarez *et al.*, 2008; Bauge *et al.*, 2013) در میان فلزات سنگین نیکل (Ni) دارای جایگاه ویژه‌ای است. برخلاف کادمیم (Cd)، سرب (Pb)، جیوه (Hg)، Ca/Mg خاک‌های سرپتین شامل مجموعه‌ای منحصر به فرد از شرایط پر تنفس زیستی می‌باشند. از ویژگی‌های تنفس زای خاک‌های سرپتین می‌توان به نسبت پایین کلسیم به منیزیم (Ca/Mg)، ظرفیت محدود نگهداری آب، کمبود شدید

ویژگی اختصاصی سمیت نیکل، شامل مهار رشد ریشه‌های جانبی می‌باشد و از این جهت با سایر فلزات سنگین از جمله کبات، مس، کادمیوم، روی و جیوه متفاوت است. جلوگیری از انشعاب ریشه توسط نیکل، احتمالاً ناشی از تجمع آن در آندودرم و دایره محیطی و اختلال در تقسیم سلولی آنها می‌باشد (Seregin *et al.*, 2003; Seregin and Kozhevnikova, 2006).

خاک‌های سرپتین عموماً تحت عنوان خاک‌هایی با تولید کم شناخته می‌شوند، زیرا شرایط نامساعد این خاک‌ها رشد گیاهان را به شدت تحت تأثیر قرار داده و محدود می‌کنند. گیاهان مقاوم موجود در خاک‌های سرپتین، سازوکارهای مختلفی را جهت رویارویی با این شرایط نامساعد به کار می‌گیرند (Ghaderian and Baker, 2007). از جمله این سازوکارها می‌توان به افزایش ستز ترکیبات و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و همچنین کدهبندی سلولی و زیر سلولی برای سمیت زدایی فلزات سنگین سمی اشاره نمود (Clements, 2001; Hall, 2002, Asemane *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2011). علاوه بر این، برخی گونه‌های گیاهی مقاوم با به کار گیری سازوکار سدکنندگی، جذب و/یا انتقال فلزات سنگین را از ریشه به بخش‌های هوایی محدود می‌کنند (Baker, 1981). گروهی دیگر از گیاهان، سازوکار بیش تجمع دهنده‌گی را به کار می‌گیرند و فلزات سنگین را بیشتر در بخش‌های هوایی خود ذخیره می‌کنند (Baker, 1981).

خاک‌های سرپتین در نواحی مختلفی از ایران، از جمله شهرستان آباده طشك واقع در استان فارس، گسترش یافته‌اند (فتاحی، ۱۳۸۴) و تا کنون مطالعات اندکی در مورد گیاهان و سازوکارهای مقاومتی آنها در این مناطق صورت گرفته است. گیاهان مربوط به جنس *Pistacia* جزء محدود گیاهان درختی هستند که قادر به رویش در شرایط نامساعد خاک‌های سرپتین می‌باشند (Ghaderian and Baker, 2007). این گیاهان از نظر اقتصادی اهمیت قابل توجهی دارند و سه گونه بنه، *P. atlantica* Desf. پسته خوارکی، *P. vera* L. و خنجک، *P. khinjuk* Stocks به طور طبیعی در ایران

نقره (Ag) و چندین فلز سنگین دیگر که جزء ترکیب آنزیم‌های گیاهی نمی‌باشند، نیکل در ساختار اوره‌آز نقش دارد و مقادیر کم نیکل (۰/۰۱ تا ۵ میکروگرم در هر گرم وزن خشک گیاه) برای برخی گونه‌های گیاهی ضروری است. از طرفی دیگر، نیکل همانند آهن، روی و مس در رشد و نمو گیاهان دخالت ندارد. با این حال، غلظت‌های بالای نیکل نیز مانند سایر فلزات سنگین برای گیاهان سمی (Seregin and Kozhevnikova, 2006; Valdez and Alexandrova, 2012).

سمیت نیکل به صورت عمومی و اختصاصی است. سمیت عمومی آن مشابه سمیت سایر فلزات سنگین می‌باشد و بر گسترهای از فرایندهای متابولیسمی گیاه تأثیر می‌گذارد (Maksymiec, 1997). از بارزترین اثرات سمی این فلزات می‌توان به افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن اشاره نمود که در آسیب‌رسانی به غشاهای پلاسمایی، اسیدهای نوکلئیک و رنگدانه‌های کلروپلاستی نقش (Fang and Kao, 2000; Tewari *et al.*, 2002; Juknys *et al.*, 2012; Agrawal *et al.*, 2013) تجمع گونه‌های فعال اکسیژن ممکن است در نتیجه عدم تعادل بین تولید آنها و فعالیت سامانه آنتی‌اکسیدان ایجاد شود. سامانه آنتی‌اکسیدان سلول شامل ترکیبات آنزیمی مانند کاتالاز (CAT) و آسکوربیات پراکسیداز (APX) و همچنین ترکیبات غیرآنژیمی از جمله گلوتاپون و کارتونیدها می‌باشد (Srivastava *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2011). نیکل و سایر فلزات سنگین قادرند با دخالت در هموستازی عناصر ضروری (مانند عناصری که در ساختمان آنزیم‌ها شرکت می‌کنند) و اتصال به گروههای فعال پروتئینی (از جمله گروه سولفیدریل) بر عملکرد بسیاری از آنزیم‌ها تأثیر بگذارند (Seregin and Kozhevnikova, 2006; Mishra and Dubey, 2013). فلزات سنگین موجب کاهش میزان کلروفیل در برگ‌ها، کاهش فتوستز و در نتیجه کاهش رشد گیاهان می‌شوند (Gajewska *et al.*, 2006; Gajewska and Skodowska, 2007; Ghasemi *et al.*, 2009; Pakdaman *et al.*, 2013).

حاصل به مدت ۲۸ روز با غلظت‌های مختلف نیکل (۰، ۰/۱، ۰/۱۵، ۰/۲۰ و ۱/۵ میلی‌مolar) در محلول غذایی پایه تغییر یافته هوگلنند، تیماردهی شدند (Parker and Norvell, 1999) غلظت‌های مختلف نیکل، با تغییر در غلظت نمک  $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  به دست آمدند. محلول غذایی پایه تغییر یافته هوگلنند (محلول کنترل فاقد نیکل) از ترکیبات شیمیایی زیر تشکیل شده بود (اعداد داخل پرانتز غلظت ماده مورد نظر را بر حسب میلی‌مolar نشان می‌دهند):

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (۱.۵)،  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (۰.۵)،  $\text{KNO}_3$  (۱)،  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (۰.۰۲)،  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (۰.۰۰۱)،  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (۰.۰۰۰۷)،  $\text{NaCl}$  (۰.۱)،  $\text{NaOH}$  (۰.۹)،  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (۰.۵)،  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (۰.۰۰۰۱)،  $\text{CuSO}_4$  (۰.۰۰۰۱)،  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (۰.۰۰۰۵)، FeEDDHA (۰.۰۵). محلول غذایی با اضافه کردن محلول ۱ مolar HCl pH یا  $\text{NaOH}$  به ۶ رسانده شد (Schat et al., 1996). قابل ذکر است که محلول‌های غذایی شاهد (فاقد نیکل) و تیمارهای حاوی نیکل، هر ۷ روز یک بار جایگزین شدند.

**اندازه گیری وزن خشک گیاهان:** پس از پایان تیماردهی، گیاهچه‌های موجود در هر گلدان برداشت شدند و بخش‌های هوایی و ریشه‌ای آنها جدا گردید. سپس به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در آون خشک شدند و وزن خشک آنها به صورت جداوله برای هر غلظت و در همه تکرارها محاسبه گردید. میزان وزن خشک گیاه، به عنوان شاخص سمیت بعد از دوره تیمار در نظر گرفته شد.

**تعیین تجمع نیکل:** به منظور تعیین و اندازه گیری میزان تجمع نیکل در بخش‌های هوایی و ریشه‌ای گیاه، مواد خشک گیاهی در اسید نیتریک ۷۰٪ تجزیه گردید و سپس به مدت ۳ ساعت در حمام شنی با دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از سرد شدن نمونه‌ها، ۱ تا ۲ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن ۳۷٪ در دمای معمولی اتاق به آنها اضافه گردید و دوباره در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند تا این که محلول شفافی به دست آمد. حجم هر نمونه، با آب مقطر به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد و غلظت

رشد می‌کنند (Farnoosh, et al., 2008). لذا هدف از این تحقیق، بررسی اثر غلظت‌های مختلف نیکل بر رشد گونه سرپتین *P. atlantica* در مقایسه با گونه‌های غیرسرپتین *P. khinjuk* و *P. vera* به منظور ارزیابی دقیق پاسخ‌های گونه سرپتین و تفسیر بهتر نتایج، بود. همچنین میزان اباحتگی نیکل و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در بخش‌های هوایی و ریشه‌ای گیاهان مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

#### مواد و روش‌ها:

**کشت گیاهان:** بذرهای گونه *P. atlantica* از جمعیت‌های روییده در خاک‌های سرپتین آباده‌شک (استان فارس) و بذرهای گونه‌های *P. vera* و *P. khinjuk* به ترتیب از مناطق غیرسرپتین جندق (استان اصفهان) و رفسنجان (استان کرمان) جمع‌آوری شدند. برای جداسازی بذرهای پوک *P. khinjuk* و *P. atlantica* تمامی بذرها در ظرف محتوی آب قرار داده شدند و سپس بذرهای پوک که روی سطح آب قرار می‌گرفتند از بذرهای سالم جدا شدند. پوسته‌های چرمی و چوبی بذرها جدا گردید و بذرها به مدت ۳۰ دقیقه در محلول ویتاواکس ۲ درصد، ضدغونی شدند. داخل هر پتری دیش شیشه‌ای ۱۰ سانتی‌متری، ۴ عدد کاغذ صافی واتمن شماره ۱ قرار گرفت و اتوکلاو گردید. بذرهای ضدغونی شده با محلول ویتاواکس، به همراه ۶ میلی‌لیتر آب مقطر به پتری دیش‌ها اضافه شدند. به صورتی که ۲ عدد کاغذ صافی زیر و ۲ عدد کاغذ صافی روی بذرها قرار گرفت. پس از ۴ الی ۵ روز، گیاهچه‌ها به گلدان‌های پلاستیکی ۹ سانتی‌متری حاوی مخلوطی از پرلیت ریز و درشت منتقل شدند. بذرهای گونه زراعی *P. vera* نیز بعد از جدا کردن پوسته چرمی، به مدت ۱۰ روز در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  و ۲ روز در آب قرار داده شدند و سپس به گلدان‌های حاوی پرلیت ریز و درشت، منتقل گشتند. گلدان‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی، در اتاق کشت قرار داده شدند. یک هفته بعد از کاشت بذرها، گیاهچه‌های

آن در ۲۵ میلی لیتر بافر واکنش (بافر فسفات سالین بدون PVP) به دست آمد و جهت تهیه محلول ۲۵۰ میلی مolar  $H_2O_2$ ، ۲۸۰ میکرو لیتر آن در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر حل گردید. سپس ۶۲۵ میکرو لیتر بافر فسفات حاوی EDTA ۱۷۵ میکرو لیتر اسید آسکوربیک، ۵۰ میکرو لیتر  $H_2O_2$ ، ۵۰ میکرو لیتر BSA و ۱۰۰ میکرو لیتر از عصاره گیاهی داخل کووت ریخته شد و جذب آنها در طول موج ۲۹۰ نانومتر قرائت گردید. در ضمن برای تهیه بلانک، از ۶۲۵ میکرو لیتر بافر فسفات حاوی EDTA، ۱۷۵ میکرو لیتر اسید آسکوربیک، ۵۰ میکرو لیتر  $H_2O_2$ ، ۵۰ میکرو لیتر BSA و ۱۰۰ میکرو لیتر آب مقطر استفاده شد. لازم به ذکر است که فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز بر اساس سرعت مصرف آسکوربات در یک میکرومول در دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد اندازه گیری شد (Nakano and Asada, 1981).

**آنالیز آماری داده ها:** برای هر یک از گونه های گیاهی محیط های کشت تغییر یافته هو گلند با غلظت های ۰، ۰/۱، ۰/۱۵، ۰/۲، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی مolar نیکل، سه تکرار در نظر گرفته شد. آنالیز آماری داده های مربوط به وزن خشک، غلظت نیکل و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان در بخش های هوایی و ریشه ای گیاهان، با استفاده از نرم افزار SPSS 18 (SPSS statistics 18) انجام گرفت. آنالیز واریانس یک راهه (ANOVA) برای بررسی تغییرات درون گونه ای وزن خشک گیاهان، مقادیر نیکل و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان در بافت های هوایی و ریشه ای انجام شد. همچنین به منظور بی بردن به معنی دار بودن یا نبودن تفاوت میانگین ها، از آزمون Duncan استفاده گردید.

#### نتایج:

رشد گیاهان: شکل ۱، نتایج مربوط به اثر غلظت های مختلف نیکل (۰/۱، ۰/۱۵، ۰/۲، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی مolar) را

نیکل موجود در این محلول ها، توسط دستگاه طیف سنج جذب اتمی (AAS, Shimadzu model 6200) تعیین گردید (Ghasemi et al., 2009).

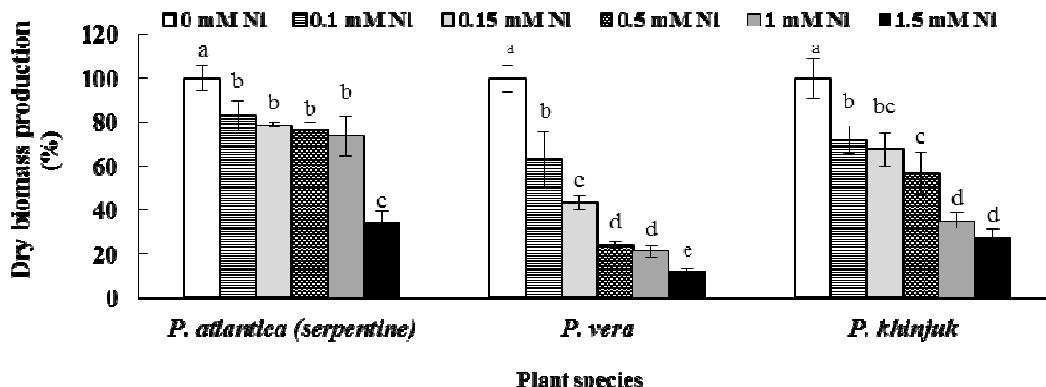
**بررسی فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان:** برای بررسی فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز، بخش های هوایی و ریشه ای گیاهان جدا گردید و در دمای -۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. ۱ گرم از بخش های هوایی و ریشه ای گیاهان در ۱/۵ میلی لیتر بافر فسفات حاوی (polyvinylpolypyrrrolidone) PVP، توسط هاون های چینی ساییده شد تا به محلول کاملاً همگنی تبدیل گردد. قابل ذکر است که تمامی مراحل ذکر شده بر روی یخ انجام گرفت. سپس بافت های عصاره گیری شده به مدت ۲۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ rpm و دمای ۴ درجه سانتی گراد، توسط دستگاه سانتریفیوژ Eppendorf AG 5415D تحت نیروی گریز از مرکز قرار گرفتند. برای تعیین فعالیت آنزیم کاتالاز، غلظت ۱۰ میلی مolar  $H_2O_2$  در بافر واکنش (بافر فسفات سالین بدون PVP) تهیه شد ۱۱۵ میکرو لیتر از  $H_2O_2$  در ۱۰۰ میلی لیتر بافر واکنش. میکرو لیتر از محلول واکنش با ۲۰ میکرو لیتر عصاره گیاهی در داخل کووت ریخته شد و میزان جذب آنها در طول موج ۲۴۰ نانومتر قرائت گردید. در ضمن ۹۸۰ میکرو لیتر از محلول واکنش به همراه ۲۰ میکرو لیتر آب مقطر برای تهیه بلانک مورد استفاده قرار گرفت. لازم به ذکر است که فعالیت یک واحد آنزیم کاتالاز براساس سرعت مصرف آب اکسیژنه در یک میکرومول در دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد اندازه گیری شد (Aebi, 1983). به منظور اندازه گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز، ابتدا ۱۰ میلی گرم BSA (bovine serum albomin) در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر حل گردید. سپس ۴۰ میلی گرم اسید آسکوربیک در ۵ میلی لیتر آب مقطر حل شد تا استوک ۵۰ میلی مolar آن تهیه شود. سپس برای تهیه محلول ۰/۵ میلی مolar آن، ۱۰۰ میلی لیتر از این استوک در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر حل گردید. محلول ۰/۲ میلی مolar EDTA، با ترکیب ۱۰ میکرو لیتر از استوک ۰/۵ میلی مolar

۰/۱ میلی مولار در محیط کشت، تغییر معنی داری در غلظت این عنصر در بخش هوایی گونه سرپیتین مشاهده نشد، اما چنانچه غلظت آن در محیط *P. atlantica* به ۰/۵ میلی مولار رسید، غلظت آن در بخش هوایی نیز به طور معنی داری افزایش یافت (شکل ۲a). تغییر تیمار نیکل از ۰/۵ به ۱ میلی مولار، تأثیر معنی داری بر غلظت آن در بخش هوایی گونه سرپیتین نداشت. با افزایش غلظت نیکل از ۱ به ۱/۵ میلی مولار در محیط، غلظت آن در بخش هوایی این گونه حدود ۲/۵ برابر افزایش یافت. گونه غیرسرپیتین *P. vera* نسبت به گونه سرپیتین، نیکل کمتری را در بخش هوایی خود تجمع داد (شکل ۲a). افزایش غلظت نیکل در محیط کشت از ۰/۱ به ۰/۵ و از ۰/۵ به ۱/۵ میلی مولار با افزایش غلظت آن در بخش هوایی گیاهان گونه *P. vera* همراه بود (شکل ۲a). نتایج نشان دادند که در مورد این گونه، تفاوت معنی داری بین ۰/۱ و ۰/۱۵ و همچنین بین ۰/۵ و ۱ میلی مولار نیکل در محیط کشت وجود نداشت. غلظت نیکل در بخش های هوایی گیاهان گونه *P. khinjuk* نسبت به دو گونه دیگر، به ویژه در غلظت ۱/۵ میلی مولار آن در محیط کشت، بیشتر بود (شکل ۲a). غلظت نیکل در بخش هوایی این گونه با افزایش تیمار آن در محیط کشت از ۰/۱ به ۰/۵، ۰/۵ به ۱ و از ۱ به ۱/۵ میلی مولار، به طور معنی داری افزایش یافت. تفاوتی میان نتایج حاصل از تیمارهای ۰/۱ و ۰/۱۵ میلی مولار نیکل در گونه *P. khinjuk* مشاهده نشد.

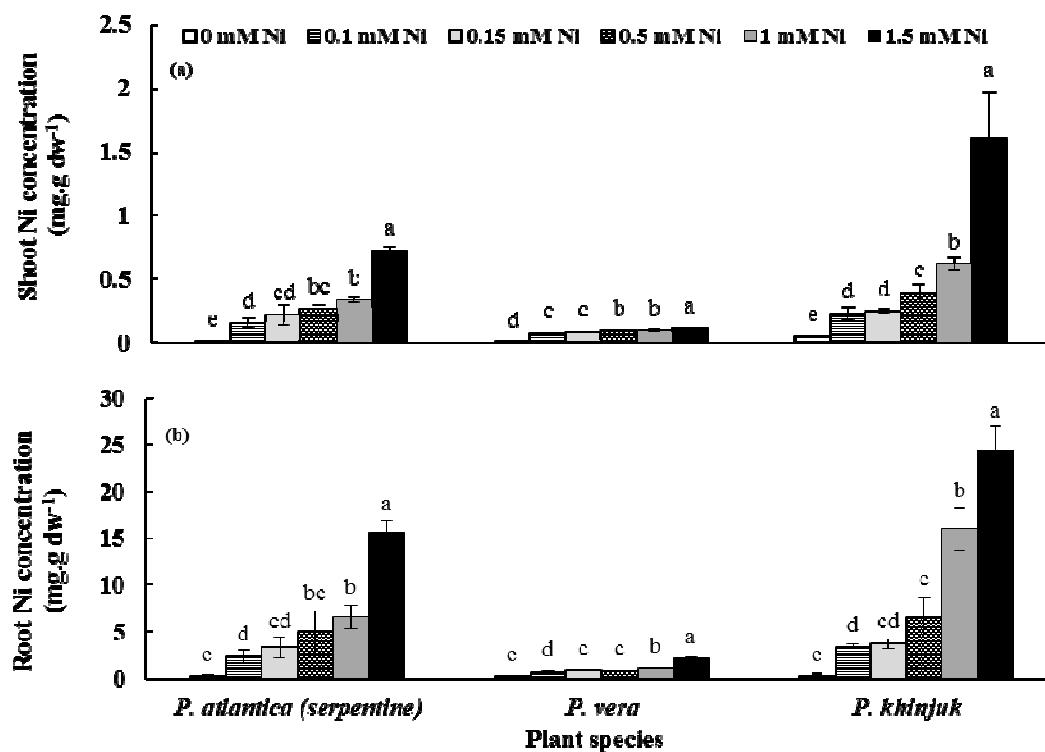
همان گونه که نتایج در شکل ۲b نشان می‌دهند، غلظت نیکل تجمع یافته در ریشه‌های گونه‌های مختلف سرپیتن و غیرسرپیتن، حدود ۱۰ برابر بیشتر از بخش‌های هوایی بود. تیمار نیکل در تمامی گونه‌های مورد مطالعه موجب افزایش تجمع نیکل در ریشه‌ها شد. غلظت نیکل در بخش‌های ریشه‌ای گونه سرپیتن *P. atlantica* با افزایش غلظت آن در محیط کشت از ۱/۰ به ۰/۵ و از ۰/۵ به ۱/۵ میلی مولار، به طور معنی‌دار افزایش یافت (شکل ۲b). تغییر غلظت نیکل از ۰/۱ به ۰/۱۵، ۰/۱۵ به ۰/۵ و همچنین از ۰/۵ به ۱

بر میزان وزن خشک نسبی (درصد) گونه‌های سرپیتین *P.* و غیرسرپیتین *P. vera* و *P. khinjuk* نشان می‌دهد. وزن خشک نسبی گونه سرپیتین *P. atlantica* رشد یافته در غاظت ۱۰٪ میلی‌مولار نیکل نسبت به نمونه شاهد کمتر بود. با افزایش غلظت نیکل در محلول غذایی از ۰/۱ تا ۱ میلی‌مولار، هیچ تغییر معنی‌داری در وزن خشک نسبی *P. atlantica* مشاهده نشد، اما غلظت بالاتر نیکل (۱/۵ میلی‌مولار) وزن خشک نسبی این گونه را کاهش داد. پاسخ گونه‌های غیر سرپیتین در این شرایط متفاوت بود. وزن خشک گونه *P. vera* رشد یافته تحت تیمارهای مختلف نیکل، نسبت به نمونه شاهد کمتر بود (شکل ۱). با افزایش غلظت نیکل از ۰/۱ به ۰/۱۵ و یا از ۰/۵ به ۰/۱۵ میلی‌مولار، وزن خشک نسبی گیاهان این گونه، به طور معنی‌داری کاهش یافت، اما تفاوتی بین تیمارهای ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار نیکل مشاهده نشد. چنانچه غلظت نیکل در محیط از ۱ به ۱/۵ میلی‌مولار رسید، رشد گیاهان به طور معنی‌دار کاهش یافت. در مورد گونه *P. khinjuk* نیز، همانند دو گونه قبلی، گیاهانی که در محیط کشت بدون نیکل رشد کردند، بیشترین وزن خشک نسبی را داشتند (شکل ۱). افزایش غلظت نیکل از ۰/۱ به ۰/۵ و از ۰/۵ به ۱/۵ میلی‌مولار در محلول غذایی، رشد نسبی این گیاهان را به طور معنی‌داری کاهش داد. تفاوتی میان وزن خشک گیاهان رشد یافته در غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۱۵، ۰/۱۵ و ۰/۵، و همچنین ۱ و ۱/۵ میلی‌مولار نیکل مشاهده نشد.

تجمع نیکل: غلظت‌های مختلف نیکل در بخش‌های هوایی و ریشه‌ای گونه‌های *P. atlantica* (سرپتین)، *P. vera* و *P. khinjuk* (غیرسرپتین) که تحت تیمار غلظت‌های مختلف نیکل در محیط کشت قرار گرفته بودند، در شکل ۲ نشان داده شده است. همان گونه که نتایج در شکل ۲a نشان می‌دهند، غلظت نیکل در بخش هوایی گیاهان شاهد، ناچیز بود ( $50\text{ }\mu\text{g.g}^{-1}$ ) و با افزودن نیکل به محیط کشت، غلظت آن به طور معنی‌داری در بافت‌های گیاهی زیاد شد. با افزایش غلظت نیکل از



نمودار ۱- تأثیر افزایش غلظت نیکل در محلول غذایی بر وزن خشک نسبی (به صورت درصدی از حداکثر رشد) گونه‌های سرپتین *P. atlantica* و غیرسرپتین *P. vera* و *P. khinjuk* مقدار، میانگین وزن خشک نسبی سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار می‌باشد. حروف متفاوت در هر ستون بیانگر معنی‌دار بودن اثر تیمار بر میزان وزن خشک نسبی گیاهان، به صورت درون گونه‌ای، با استفاده از آزمون Duncan می‌باشدند ( $P<0.05$ ).



نمودار ۲- تغییر در غلظت نیکل در بخش‌های هوایی (a) و ریشه‌ای (b) گونه‌های سرپتین *P. atlantica* و غیرسرپتین *P. vera* و *P. khinjuk* در پاسخ به افزایش غلظت نیکل (از ۰ تا ۱/۵ میلی‌مolar) در محیط کشت. مقدار، میانگین سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار می‌باشدند. حروف متفاوت در هر ستون بیانگر معنی‌دار بودن اثر تیمار بر میانگین غلظت نیکل، به صورت درون گونه‌ای، با استفاده از آزمون Duncan می‌باشدند ( $P<0.05$ ).

نیکل تجمع یافته در ریشه گیاهان غیرسرپتین *P. vera* نسبت به دو گونه دیگر *P. atlantica* (سرپتین) و

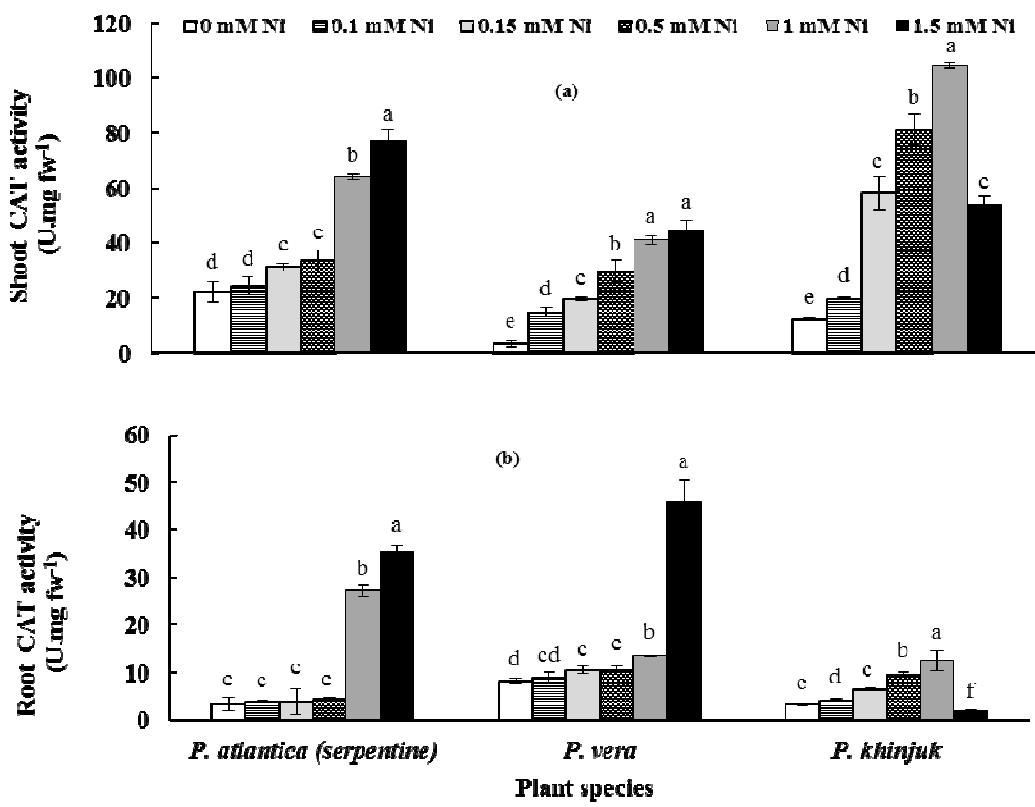
میلی‌مolar در محیط کشت، تأثیر معنی‌داری بر تجمع این عنصر در بخش ریشه‌ای گونه سرپتین نداشت. غلظت

آنتی‌اکسیدان کاتالاز در بخش‌های هوایی می‌شود (شکل ۳a). همان طور که نتایج نشان می‌دهند، فعالیت آنزیم کاتالاز در بخش‌های هوایی این گونه زراعی با افزایش غلظت نیکل از ۰/۱۵-۰/۰ میلی‌مولار در محیط کشت، افزایش یافت. تغییر غلظت نیکل در محیط کشت از ۱ به ۰/۵ میلی‌مولار تأثیر معنی‌داری بر فعالیت کاتالاز در بخش‌های هوایی گونه مزبور نداشت (شکل ۳a). افزایش غلظت نیکل از ۰-۰/۰ میلی‌مولار در محیط با افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم کاتالاز در بخش‌های هوایی گونه‌های غیر سرپیتین *P. vera* و *P. khinjuk* همراه بود (شکل ۳a). چنانچه غلظت نیکل در محیط از ۱ به ۰/۵ میلی‌مولار افزایش یافت، فعالیت آنزیم کاتالاز در بخش هوایی گونه *P. vera* تغییر معنی‌داری نکرد اما در گونه *P. khinjuk* کاهش یافت. در مورد گونه غیرسرپیتین *P. khinjuk* تفاوت معنی‌داری میان فعالیت کاتالاز در بخش‌های هوایی گیاهانی که با ۰/۱۵ و یا ۰/۵ میلی‌مولار نیکل تیمار شده بودند، مشاهده نشد (شکل ۳a).

همان گونه که نتایج در شکل ۳ نشان می‌دهند، فعالیت آنزیم کاتالاز در بخش‌های هوایی گونه‌های مختلف تحت تیمار نیکل تقریباً دو برابر بخش‌های ریشه‌ای بود. افزایش غلظت نیکل در محیط کشت از ۰-۰/۵ میلی‌مولار تأثیر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم کاتالاز در بخش‌های ریشه‌ای نیکل در شکل ۳ نشان داده شده است. همان گونه که نتایج نشان می‌دهند، تغییر معنی‌داری در فعالیت آنزیم کاتالاز در بخش‌های هوایی گونه سرپیتین *P. atlantica* و غیر سرپیتین *P. vera* و *P. khinjuk* رشد یافته در محیط‌های کشت دارای غلظت‌های مختلف نیکل در شکل ۳ نشان داده شده است. همان گونه که نتایج نشان می‌دهند، تغییر معنی‌داری در فعالیت آنزیم کاتالاز در بخش‌های هوایی گونه سرپیتین *P. atlantica* در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار نیکل نسبت به نمونه شاهد مشاهده نشد (شکل ۳a). با افزایش غلظت نیکل در محیط کشت از ۰/۱ به ۰/۱۵ میلی‌مولار، فعالیت آنزیم کاتالاز در بخش‌های هوایی گونه سرپیتین افزایش یافت، اما تفاوت معنی‌داری میان نتایج حاصل از تیمارهای ۰/۱۵ و ۰/۵ میلی‌مولار نیکل در محیط کشت وجود نداشت. فعالیت آنزیم کاتالاز در ریشه‌ها با افزایش غلظت نیکل از ۰ به ۰/۱ و یا از ۰/۱ به ۰/۱۵ میلی‌مولار در محیط، تغییر معنی‌داری نکرد (شکل ۳b). چنانچه غلظت نیکل در محیط کشت از ۰ به ۰/۱ رسید، فعالیت این آنزیم افزایش یافت. تفاوت معنی‌داری میان نتایج حاصل از تیمارهای ۰/۱۵ و ۰/۵ میلی‌مولار نیکل مشاهده نشد، اما فعالیت آنزیم کاتالاز در بخش‌های ریشه‌ای *P. vera* با افزایش غلظت نیکل در

(غیرسرپیتین)، به ویژه در غلظت‌های بالای نیکل در محیط کشت، کمتر بود (شکل ۲b). همان گونه که نتایج نشان می‌دهند، افزایش غلظت نیکل در محیط کشت از ۰/۱ به ۰/۱۵، ۰/۰ به ۱ و همچنین از ۱ به ۰/۵ میلی‌مولار موجب افزایش انباشتگی (غلظت) نیکل در ریشه‌های گونه *P. vera* شد. تفاوت معنی‌داری میان نتایج حاصل از تیمارهای ۰/۱۵ و ۰/۵ میلی‌مولار نیکل در بخش ریشه‌ای گونه نداشت (شکل ۲b). تجمع نیکل در بخش ریشه‌ای گونه غیرسرپیتین *P. khinjuk* نسبت به دو گونه سرپیتین *P. atlantica* و غیرسرپیتین *P. vera*، به ویژه در غلظت‌های ۱/۰ میلی‌مولار نیکل در محیط کشت، به طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر بود (شکل ۲b). افزایش غلظت نیکل در محیط از ۰/۱۵ تا ۱/۰ میلی‌مولار موجب افزایش تجمع آن در ریشه‌های گیاهان گونه *P. khinjuk* شد (شکل ۲b). تفاوت معنی‌داری میان نتایج مربوط به تیمارهای ۰/۱ و ۰/۱۵ میلی‌مولار نیکل در محیط کشت مشاهده نشد.

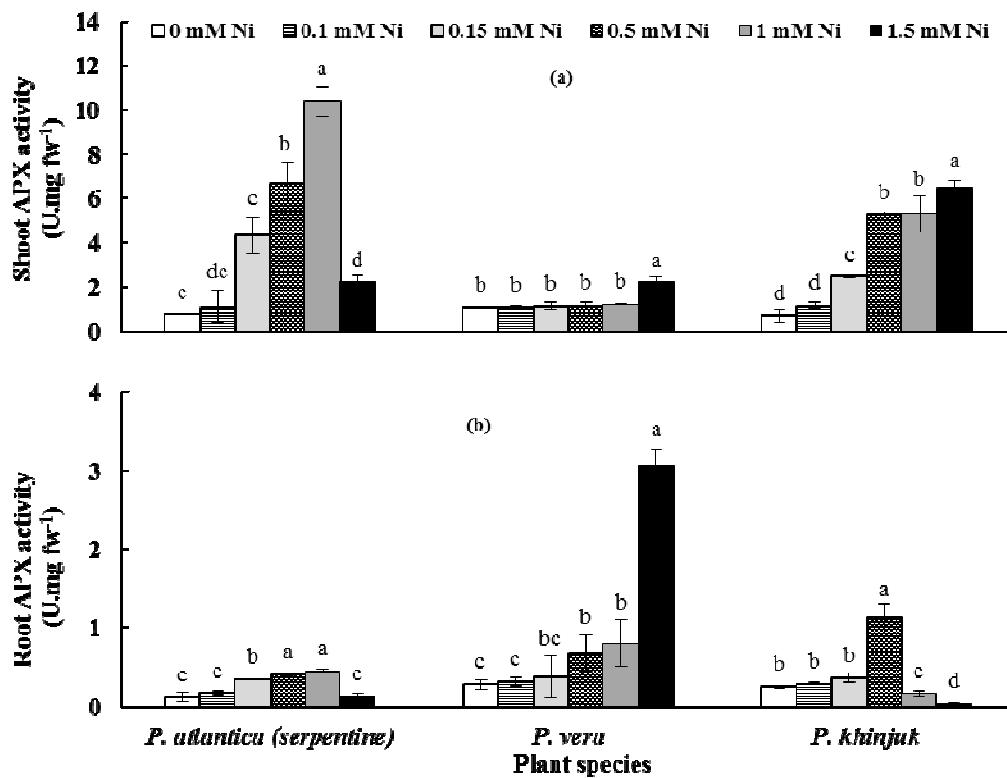
**فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان:** فعالیت آنزیم کاتالاز در بخش‌های هوایی و ریشه‌ای گونه‌های سرپیتین *P. atlantica* و غیر سرپیتین *P. vera* و *P. khinjuk* یافته در محیط‌های کشت دارای غلظت‌های مختلف نیکل در شکل ۳ نشان داده شده است. همان گونه که نتایج نشان می‌دهند، تغییر معنی‌داری در فعالیت آنزیم کاتالاز در بخش‌های هوایی گونه سرپیتین *P. atlantica* در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار نیکل نسبت به نمونه شاهد مشاهده نشد (شکل ۳a). با افزایش غلظت نیکل در محیط کشت از ۰/۱ به ۰/۱۵ میلی‌مولار، فعالیت آنزیم کاتالاز در بخش‌های هوایی گونه سرپیتین افزایش یافت، اما تفاوت معنی‌داری میان نتایج حاصل از تیمارهای ۰/۱۵ و ۰/۵ میلی‌مولار نیکل در محیط کشت وجود نداشت. فعالیت آنزیم کاتالاز در بخش هوایی گونه مزبور با افزایش غلظت نیکل از ۰/۵ به ۰/۱۵ میلی‌مولار در محیط کشت، به طور معنی‌دار افزایش یافت (شکل ۳a). در گونه *P. vera* مشاهده شد که تیمار نیکل در محیط کشت موجب افزایش فعالیت آنزیم



نمودار ۳- تغییر در میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) در بخش‌های هوایی (a) و ریشه‌ای (b) گونه‌های سرپتین *P. atlantica* و غیرسرپتین *P. vera* و *P. khinjuk* در پاسخ به افزایش غلظت نیکل (از ۰ تا ۱/۵ میلی‌مولار) در محیط کشت. مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار می‌باشند. حروف متفاوت در هر ستون یانگر معنی‌دار بودن اثر تیمار بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز، به صورت درون گونه‌ای، با استفاده از آزمون Duncan می‌باشدند ( $P<0.05$ ).

سرپتین و غیرسرپتین رشد کرده در محیط‌های دارای غلظت‌های مختلف نیکل، در شکل ۴ نشان داده است. همان گونه که نتایج نشان می‌دهند فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در بخش‌های هوایی گیاهان به مراتب بیشتر از بخش‌های ریشه‌ای بود. در گونه سرپتین *P. atlantica* مشاهده شد که فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در بخش‌های هوایی در شرایط ۰/۱ میلی‌مولار نیکل تفاوت معنی‌داری با نمونه شاهد نداشت (شکل ۴a). افزایش غلظت نیکل از ۰/۱-۱ میلی‌مولار در محیط کشت با افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در بخش‌های هوایی این گونه همراه بود. مشاهده شد که فعالیت این آنزیم آنتی‌اسکیدان در بخش‌های هوایی گونه *P. atlantica* در بالاترین غلظت (۱/۵ میلی‌مولار) نیکل در محیط کمتر

محیط کشت از ۰/۵ به ۱/۵ میلی‌مولار، بیشتر شد. همان گونه که نتایج در شکل ۳b نشان می‌دهند، تأثیر غلظت‌های زیاد نیکل (۱ و ۱/۵ میلی‌مولار) در محیط بر فعالیت آنزیم کاتالاز در بخش‌های ریشه‌ای گونه *P. khinjuk* کمتر از دو گونه دیگر بود. در گیاهان گونه *P. khinjuk* مشاهده گردید که افزایش غلظت نیکل در محیط کشت از ۰-۱ میلی‌مولار موجب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم کاتالاز در ریشه‌ها شد. چنانچه غلظت نیکل در محیط از ۱ به ۱/۵ میلی‌مولار، فعالیت آنزیم کاتالاز در ریشه‌های این گونه حدود ۷ برابر کاهش یافت و حتی به مقادیری کمتر از نمونه شاهد رسید. آنزیم آنتی‌اسکیدان دیگری که در این تحقیق مورد مطالعه قرار گرفت، آنزیم آسکوربات پراکسیداز بود. فعالیت این آنزیم در بخش‌های هوایی و ریشه‌ای گونه‌های



نمودار ۴- تغییر در میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) در بخش‌های هوایی (a) و ریشه‌ای (b) گونه‌های سرپتین *P. atlantica* و غیرسرپتین *P. vera* و *P. khinjuk* در پاسخ به افزایش غلظت نیکل (از ۰ تا ۱/۵ میلی‌مolar) در محیط کشت. مقادیر میانگین سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار می‌باشند. حروف متفاوت در هر ستون بیانگر معنی دار بودن اثر تیمار بر میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز، به صورت درون گونه‌ای، با استفاده از آزمون Duncan ( $P<0.05$ ).

گونه مزبور افزایش یافت. لازم به ذکر است که تفاوت معنی‌داری میان فعالیت این آنزیم آنتی‌اکسیدان در غلظت‌های ۰/۵ و ۱/۰ میلی‌مolar نیکل مشاهده نشد.

همان گونه که نتایج در شکل ۴b نشان می‌دهند، فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در بخش‌های ریشه‌ای *P. atlantica* گونه سرپتین در نمونه شاهد تفاوت معنی‌داری با غلظت ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌مolar نیکل در محیط کشت نداشت. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در بخش‌های ریشه‌ای گونه مزبور با افزایش غلظت نیکل از ۰/۱-۰/۵ میلی‌مolar در محیط افزایش یافت، اما تفاوتی میان نتایج حاصل از تیمارهای ۰/۵ و ۱ میلی‌مolar نیکل وجود نداشت (شکل ۴b). افزایش غلظت نیکل از ۰-۰/۱۵ میلی‌مolar در محیط کشت، تغییر معنی‌داری در فعالیت

از غلظت‌های ۰/۱۵-۰ میلی‌مolar آن بود. به گونه‌ای که تفاوت معنی‌داری میان فعالیت این آنزیم در غلظت ۰/۵ و ۰/۰ مشاهده نشد (شکل ۴a). فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در بخش‌های هوایی گیاهان گونه *P. vera* با افزایش غلظت نیکل از ۰-۱ میلی‌مolar در محیط، تغییر معنی‌داری نکرد (شکل ۴a). حداقل فعالیت این آنزیم در بخش‌های هوایی گونه مزبور در بیشترین غلظت، یعنی غلظت ۰/۵ میلی‌مolar، نیکل مشاهده شد. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در بخش‌های هوایی گونه گونه غیرسرپتین *P. khinjuk* در غلظت ۰/۱ میلی‌مolar نیکل نسبت به نمونه شاهد، تغییر معنی‌داری نکرد (شکل ۴a). با افزایش غلظت نیکل در محیط از ۰-۱/۵ میلی‌مolar، فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در بخش‌های هوایی

(*khinjuk*) می‌باشد. نظریه چنین نتایجی، مبنی بر مقاومت بالای گونه‌های سرپتین در مقایسه با گونه‌های غیرسرپتین، در گذشته نیز توسط برخی پژوهش‌گران گزارش شده است (e.g. Asemaneh *et al.*, 2006; Kazakou *et al.*, 2010; Juknys *et al.*, 2012)

نتایج مربوط به جذب اتمی نیکل در بافت‌های گیاهی نشان دادند که غلظت نیکل در بخش‌های ریشه‌ای تمامی گونه‌های مورد مطالعه حدود ۱۰ برابر بیشتر از بخش‌های هوایی بود. بنابراین مطابق با تعریفی که توسط Baker (۱۹۸۱) ارائه شد، گونه‌های *Pistacia* جزء گیاهان سد کننده هستند که انتقال فلزات سنگین را از ریشه به بخش‌های هوایی محدود می‌کنند. در این تحقیق مشخص گردید که گونه *P. vera* (پسته خوارکی)، یک سد کننده قوی نیکل می‌باشد، به طوری که غلظت نیکل در بخش‌های هوایی و حتی ریشه‌ای آن بسیار کمتر از دو گونه دیگر (*P. khinjuk* و *P. atlantica*) بود. این مطلب با توجه به اهمیت خوارکی و اقتصادی میوه این گونه زراعی بسیار حائز اهمیت است.

با توجه به این که غلظت نیکل در بافت‌های هوایی گونه سرپنین *P. atlantica* به طور محسوسی کمتر از گونه‌های غیرسرپتین *P. vera* و *P. khinjuk* نبود، تصور می‌شود که سازوکارهای سمیت زدایی در افزایش تحمل گونه سرپتین، نسبت به غلظت‌های زیاد نیکل در محیط، دخالت داشته باشند. در مطالعات گذشته، تنش اکسیداتیو به عنوان مهم‌ترین اثر سمی فلزات سنگین معروف شده است (Tamas *et al.*, 2008; Radwan *et al.*, 2010) (Agrawal *et al.*, 2013). نیکل از جمله فلزاتی است که از طریق تداخل با واکنش‌های فتوستزی موجب افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن در سلول می‌شود (Sharma and Dietz, 2009).

تشنج اکسیداتیو در بافت‌های گیاهی توسط یک سامانه آنتی‌اکسیدان، کنترل می‌شود. این سامانه شامل آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، از جمله کاتالاز و پراکسیداز، و همچنین ترکیبات غیرآنزیمی

آنزیم آسکوربات پراکسیداز در بخش‌های ریشه‌ای گونه *P. vera*، ایجاد نکرد (شکل ۴b). چنانچه این غلظت از ۰/۱ به ۰/۵ میلی‌مolar افزایش یافت، فعالیت آنزیم مذبور نیز زیاد شد، اما تفاوتی میان نتایج حاصل از تیمارهای ۰/۱ و ۰/۱۵ و همچنین ۰/۱۵ و ۰/۵ میلی‌مolar نیکل وجود نداشت. افزایش غلظت نیکل از ۱ به ۱/۵ میلی‌مolar موجب افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در ریشه‌های گونه *P. vera* شد، اما تفاوتی میان غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌مolar وجود نداشت. حداقل فعالیت (حدود ۱ U.mg fw<sup>-1</sup>) آنزیم آسکوربات پراکسیداز در بخش‌های ریشه‌ای گونه *P. Khinjuk*، در غلظت ۰/۵ میلی‌مolar نیکل مشاهده شد (شکل ۴b). افزایش غلظت نیکل در محیط کشت از ۰/۱۵ میلی‌مolar کاهش یافت، فعالیت این آنزیم آنتی‌اکسیدان به دنبال نداشت. چنانچه غلظت نیکل در محیط از ۰/۵ میلی‌مolar موجب افزایش یافت، فعالیت آنزیم به طور معنی‌داری کم شد. فعالیت آسکوربات پراکسیداز در بخش‌های ریشه‌ای گونه *P. khinjuk* در غلظت‌های ۱ و ۱/۵ میلی‌مolar نیکل کمتر از غلظت ۰/۱۵ میلی‌مolar آن بود (شکل ۴b).

## بحث:

غلظت زیاد نیکل در خاک‌های سرپتین، یکی از تنفس‌های اساسی برای رشد گیاهان در این مناطق به شمار می‌رود (Proctor, 1999; Kazakou *et al.*, 2010). با این وجود، جمعیت‌های گیاهی روییده در خاک‌های سرپتین، سازگاری‌های متعددی برای رویارویی با این تنفس محیطی کسب نموده‌اند (Ghasemi *et al.*, 2009; Kazakou *et al.*, 2010). گیاه *P. atlantica* از معدود گیاهان درختی است که قادر به رویش در خاک‌های سرپتین و بنابراین تحمل غلظت‌های بالای نیکل در این مناطق می‌باشد (Ghaderian and Baker, 2007). پاسخ رشد گونه سرپتین *P. atlantica* به افزایش غلظت نیکل محیط در تحقیق حاضر، نشان دهنده تحمل بیشتر گیاهان سرپتین نسبت به گیاهان غیرسرپتین (*P. vera* و

است که می‌تواند در سمیت زدایی نیکل و افزایش تحمل گونه سرپتین، در مقایسه با گونه‌های غیرسرپتین، نقش داشته باشد.

فلزات سنگین، ضمن افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن، با مهار فعالیت سامانه آنتی‌اکسیدان موجب تشدید استرس اکسیداتیو در سلول می‌شوند. در واقع فلزات سنگین ممکن است با اتصال به گروه سولفیدریل آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از عملکرد آنها ممانعت کنند (Valko *et al.*, 2005; Sharma and Dietz, 2009) تحقیق نیز مشاهده شد که در گونه‌های *P. atlantica* و یا *P. khinjuk* غلظت‌های بالای نیکل ( $\leq 1$  میلی‌مولار) ممکن است از فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز و یا آسکوربات پراکسیداز به شدت ممانعت کنند.

#### تشکر و قدردانی:

بدین وسیله از مدیریت تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان به‌واسطه حمایت مالی از این پژوهه و نیز آقای دکتر رسول قاسمی به‌دلیل کمک‌های ارزنده در انجام آنالیزهای جذب اتمی تشکر و قدردانی می‌شود."

با وزن مولکولی کم، مانند آسکوربات، می‌باشد تحقیق نیز مشخص گردید که فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در گونه‌های *Pistacia* رابطه نسبتاً مستقیمی با غلظت نیکل در محیط دارد. همچنین فعالیت این آنزیم‌ها در بافت‌های هوایی به مراتب بیش از بافت‌های ریشه‌ای بود، که احتمالاً به منظور حفاظت سازوکارهای فتوستزی در برابر استرس اکسیداتیو می‌باشد (Sharma and Dietz, 2009). فعالیت آنزیم کاتالاز در بخش‌های هوایی گونه سرپتین، *P. atlantica* تفاوت زیادی با گونه‌های غیرسرپتین (*P. khinjuk* و *P. vera*) نداشت. بنابراین آنزیم کاتالاز، ضمن این که در سمیت زدایی نیکل در تمامی گونه‌های *Pistacia* نقش داشت، مسئول تحمل بیشتر گونه سرپتین، نسبت به گونه‌های غیر سرپتین، در برابر غلظت‌های زیاد نیکل نمی‌باشد. افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در بخش‌های هوایی گونه سرپتین *P. atlantica* در پاسخ به افزایش غلظت نیکل در محیط کشت، به ترتیب حدود ۶ و ۱/۵ برابر بیشتر از گونه‌های غیرسرپتین *P. vera* و *P. khinjuk* بود. بنابراین آنزیم آسکوربات پراکسیداز از جمله آنزیم‌هایی

#### منابع:

- Fatahi, H. (۱۳۸۴) بررسی میزان عناصر نیکل، کروم و کالت در گیاهان سرپتین نواحی آباده طشك، استان فارس. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.
- Aebi, H. (1983) Catalase *in vitro*. Methods in Enzymology 105: 121-126.
- Agrawal, B., Czymbek, K. J., Sparks, D. L. and Bais, H. P. (2013) Transient influx of nickel in root mitochondria modulates organic acid and reactive oxygen species production in nickel hyperaccumulator *Alyssum murale*. Journal of Biological Chemistry 288: 7351-7362.
- Asemaneh, T., Ghaderian, S. M., Crawford, S. A., Marshal, A. T. and Baker, A. J. M. (2006) Cellular and subcellular compartmentation of Ni in the Eurasian serpentine plants *Alyssum bracteatum*, *Alyssum murale* (Brassicaceae) and *Cleome heratensis* (Capparaceae). Planta 225: 193-202.
- Baker, A. J. M. (1981) Accumulators and excluders strategies in the response to heavy metals. Journal of Plant Nutrition 3: 643-654.
- Bauge, S. M., Lavkulich, L. M. and Schreier, H. E. (2013) Phosphorous and trace metals in serpentine-affected soils of the Sumas Basin, British Columbia. Canadian Journal of Soil Science 93: 359-367.
- Caranza-Alvarez, C., Alonso-Castro, A. J., Alfaro-De La Torre, M. C. and Garcia-De La Cruz, R. F. (2008) Accumulation and distribution of heavy metals in *Scirpus americanus* and *Typha latifolia* from an artificial lagoon in San Luis Potosí, México. Water, Air, and Soil Pollution 188: 297-309.
- Clements, S. (2001) Molecular mechanism of plant metal tolerance and homeostasis. Planta 212: 475-486.
- Fang, W. C. and Kao, C. H. (2000) Enhanced peroxidase activity in rice leaves in response to

- Parker, D. R. and Norvell, W. A. (1999) Advances in solution culture methods for plant mineral nutrition research. *Advances Agronomy* 65: 151-213.
- Proctor, J. (1999) Toxins, nutrient shortages and droughts: the serpentine challenge. *Trends in Ecology and Evolution* 14: 334-335.
- Radwan, M. A., El-Gendy, K. S. and Gad, A. F. (2010) Biomarkers of oxidative stress in the land snail, *Theba pisana* for assessing ecotoxicological effects of urban metal pollution. *Chemosphere* 79: 40-46.
- Schat, H., Vooijs, R. and Kuiper, E. (1996) Identical major gene loci for heavy metal tolerances that have independently evolved in different local populations and subspecies of *Silene vulgaris*. *Evolution* 50: 1888-1895.
- Seregin, I. V. and Kozhevnikova, A. D. (2006) Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. *Fiziologiya Rastenii* 53: 285-308.
- Seregin, I. V., Kozhevnikova, A. D., Kazymina, E. M., and Ivanov, V. B. (2003) Nickel toxicity and distribution in maize roots. *Russian Journal of Plant Physiology* 50: 793-800.
- Sharma, S. S. and Dietz, K. J. (2009) The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends in Plant Science* 14: 43-50.
- Srivastava, S., Tripathi, R. D. and Dwivedi, U. N. (2004) Synthesis of phytochelatins and modulation of antioxidants in response to cadmium stress in *Cuscuta reflexa*—an angiospermic parasite. *Plant Physiology* 161: 665-674.
- Tamas, L., Dudikova, J., Durcekova, K., Huttova, J., Mistrik, I. and Zelinova, V. (2008) The impact of heavy metals on the activity of some enzymes along the barley root. *Environmental and Experimental Botany* 62: 86-91.
- Tewari, R. K., Kumar, P., Sharma, P. N. and Bisht, S. S. (2002) Modulation of oxidative stress responsive enzymes by excess cobalt. *Plant Science* 162: 381-388.
- Valdez, C. E. and Alexandrova, A. N. (2012) Why urease is a di-nickel enzyme whereas the CcrA  $\beta$ -lactamase is a di-zinc enzyme. *The Journal of Physical Chemistry B* 116: 10649-10656.
- Valko, M., Morris, H. and Cronin, M. T. (2005) Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medical Chemistry* 12: 1161-1208.
- Zhao, Y., Peralta-Videa, J. R., Lopez-Moreno, M. L., Ren, M., Saupe, G. and Gardea-Torresdey, J. L. (2011) Kinetin increases chromium absorption, modulates its distribution, and changes the activity of catalase and ascorbate peroxidase in Mexican Palo Verde. *Environmental Science and Technology* 45: 1082-1087.
- excess iron, copper and zinc. *Plant Science* 158: 71-76.
- Farnoosh, R., Tavakoli, J. and Haddad Khodaparast, M. H. (2008) Chemical composition and oxidative stability of kernel oils from two current subspecies of *Pistacia atlantica* in Iran. *Journal of the American Oil Chemists Society* 85: 723-729.
- Gajewska, E. and Skodowska, M. (2007) Relations between tocopherol, chlorophyll and lipid peroxides contents in shoots of Ni-treated wheat. *Journal of Plant Physiology* 164: 364-366.
- Gajewska, E., Skodowska, M., Saba, M. and Mazur, J. (2006) Effect of nickel on antioxidative enzyme activities and chlorophyll contents in wheat shoots. *Biology of Plant* 50: 653-659.
- Ghaderian, S. M. and Baker, A. J. M. (2007) Geobotanical and biogeochemical reconnaissance of the ultramafics of Central Iran. *Journal of Geobotanical Exploration* 92: 34-42.
- Ghasemi, R., Ghaderian, S. M. and Krämer, U. (2009) Interference of nickel with copper and iron homeostasis contributes to metal toxicity symptoms in the nickel hyperaccumulator plant *Alyssum inflatum*. *New Phytologist* 184: 566-580.
- Hall, J. L. (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 53: 1-11.
- Juknys, R., Vitkauskaitė, G., Racaičiūtė, M. and Vencloviene, J. (2012) The impacts of heavy metals on oxidative stress and growth of spring barley. *Central European Journal of Biology* 7: 299-306.
- Kazakou, E., Adamidis, G. C., Baker, A. J., Reeves, R. D., Godino, M. and Dimitrakopoulos, P. G. (2010) Species adaptation in serpentine soils Lesvos Island (Greece): metal hyperaccumulation and tolerance. *Plant and Soil* 332: 369-385.
- Maksymiec, W. (1997) Effect of copper on cellular processes in higher plants. *Photosynthetica* 34: 321-342.
- Mishra, P. and Dubey, R. S. (2013) Excess nickel modulates activities of carbohydrate metabolizing enzymes and induces accumulation of sugars by upregulating acid invertase and sucrose synthase in rice seedlings. *Biometals* 26: 97-111.
- Nakano, Y. and Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology* 22: 876-880.
- Pakdaman, N., Ghaderian, S. M., Ghasemi, R. and Asemaneh, T. (2013) Effects of calcium/magnesium quotients and nickel in the growth medium on growth and nickel accumulation in *Pistacia atlantica*. *Journal of Plant Nutrition* 36: 1708-1718.