

## تأثیر تغذیه‌برگی کمپلکس نیکل - اوره بر متابولیسم نیتروژن و عملکرد کاهو در محلول غذایی حاوی اوره

هدی حسینی و امیرحسین خوشگفتارمنش\*

گروه خاکشناسی، دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۳/۰۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۶/۰۳)

### چکیده:

این مطالعه با هدف بررسی تأثیر تغذیه‌برگی نیکل از دو منبع کمپلکس نیکل-اوره و کلریدنیکل بر رشد و عملکرد و متابولیسم نیتروژن دو رقم کاهو (*Lactuca sativa* L) شامل کونکوایستادور (Conco- istador) و گریزلی (Grizzly) تغذیه شده با اوره در محیط آبکشت انجام شد. یک تیمار تغذیه برگی با محلول اوره (بدون نیکل) و یک تیمار شاهد (بدون تغذیه‌برگی اوره یا نیکل) نیز استفاده شد. نتایج نشان داد که تغذیه‌برگی نیکل صرف‌نظر از منبع آن سبب افزایش وزن تر و خشک شاخساره دو رقم کاهو شد. کاربرد نیکل به روش تغذیه‌برگی سبب افزایش غلظت نیکل شاخساره شد اگرچه این افزایش با کمپلکس نیکل-اوره در مقایسه با کلریدنیکل بیشتر بود. تغذیه‌برگی نیکل همچنین سبب افزایش فعالیت آنزیم اوره‌آز و کاهش انباشت اوره در هر دو رقم کاهو شد. تغذیه‌برگی نیکل سبب کاهش غلظت نترات و آمونیوم شاخساره نسبت به تیمار شاهد شد. همچنین افزایش فعالیت آنزیم گلوتامین-ستتاز (GS) با کاربرد برگی نیکل مشاهده شد. به طور کلی کاربرد تغذیه‌برگی نیکل با بهبود متابولیسم نیتروژن سبب افزایش عملکرد کاهو شد.

کلمات کلیدی: آنزیم اوره‌آز، اوره، کمپلکس نیکل-اوره، کاهو، گلوتامین ستتاز

### مقدمه:

محصولات کشاورزی اشاره شده است. مشاهدات Atta-Aly (۱۹۹۹) نشان داد که با افزودن ۲۵ و ۵۰ میلی گرم نیکل در کیلوگرم خاک، عملکرد گیاه جعفری به طور معنی‌داری افزایش یافت و همچنین نیکل با کاهش غلظت نترات برگ، باعث بهبود کیفیت تغذیه‌ای این گیاه شد. در مطالعه دیگر Khoshgoftarmanesh و Bahmanziyari (۲۰۱۲) با بررسی سطوح مختلف نیکل (۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار) بر رشد، عملکرد و کیفیت دو رقم خیار نشان دادند که افزایش سطح نیکل محلول غذایی باعث

نیکل به عنوان یک عنصر ضروری کم‌مصرف شناخته شده است. شناسایی نیکل به عنوان بخشی از آنزیم اوره‌آز در سال ۱۹۷۵، اولین مطالعات بنیادی برای اثبات ضرورت نیکل برای گیاه را پایه‌گذاری نمود. مطالعات Polacco (۱۹۷۷) نشان داد که سلول‌های کشت‌بافت، زمانی که ترکیب اوره منبع تأمین کننده نیتروژن باشد و نیکل در محیط رشد موجود نباشد، قادر به رشد نیستند. در بسیاری از مطالعات به نقش مؤثر نیکل بر رشد، عملکرد و کیفیت

\* نویسنده مسئول، نشانی پست الکترونیکی: Amirhkhosh@cc.iut.ac.ir

در مقایسه با کلرید نیکل بر رشد، عملکرد و متابولیسم نیتروژن دو رقم کاهوی تغذیه شده با اوره مورد آزمون قرار گرفت.

### مواد و روش‌ها

**کاشت گیاه:** در این مطالعه برای تهیه نشاء، بذر دو رقم کاهو (*Lactuca sativa* L.) شامل کونکواستادور (Conoco- istador) و گریزلی (Grizzly) در بستر ماسه کاشته شد. پس از شستشوی کامل بستر ماسه‌ای توسط اسیدکلریدریک رقیق و آب مقطر، بذور کاهو در ردیف‌هایی به فواصل ۱۰ سانتی‌متری در عمق ۲ سانتی‌متری از سطح ماسه کشت شدند. آبیاری با استفاده از آب مقطر به‌طور روزانه انجام شد. پس از گذشت حدود سه هفته از زمان تهیه نشاء، گیاهچه‌های کاهو به ظروف حاوی محلول غذایی انتقال داده شد. جایگزینی محلول‌غذایی یک‌بار در هفته انجام شد. در این فاصله زمانی، سطح محلول‌غذایی روزانه کنترل شده و در صورت کاهش حجم محلول، آب مقطر به ظروف اضافه شد. pH محلول غذایی نیز هر دو روز یک بار کنترل شده و در صورت نیاز با استفاده از هیدروکسیدسدیم و یا اسیدهیدروکلریک ۰/۱ نرمال در pH حدود ۶/۰ تنظیم شد. تیمارهای آزمایش شامل دو رقم کاهو و چهار تیمار تغذیه‌برگی نیکل (شاهد، تغذیه‌برگی اوره، کلریدنیکل، کمپلکس نیکل- اوره) بودند. دو هفته بعد از انتقال نشاءها، اوره با غلظت ۱/۵ میلی‌مولار به محلول غذایی اضافه شده و تغذیه‌برگی کلریدنیکل و کمپلکس نیکل-اوره نیز، با غلظت ۲۵ میکرومولار، دو بار در هفته انجام شد. تغذیه‌برگی اوره نیز، بر اساس غلظت اوره مصرف شده از طریق تغذیه برگی کمپلکس نیکل- اوره (۷۵ میکرومولار)، محاسبه شد. این آزمایش فروردین ماه (۹۱/۱/۲۰) آغاز و در خرداد ماه (۹۱/۳/۲۵) به پایان رسید. دو هفته پس از اعمال تیمارها، ریشه و شاخساره گیاهان به‌طور جداگانه برداشت شده و با آب مقطر شسته شدند. پس از اندازه‌گیری وزن تر، نمونه‌های گیاهی به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۶۵ درجه سلسیوس در خشک کن قرار گرفته و وزن خشک شاخساره نیز محاسبه شد.

افزایش غلظت نیکل برگ و مقدار اسیدآسکوربیک میوه شد. همچنین Wood و همکاران (۲۰۰۴) نیز به ضرورت کاربرد نیکل برای رشد گیاهان در شرایط مزرعه اشاره کردند. تأثیر مثبت تغذیه‌برگی نیکل بر افزایش عملکرد سیب‌زمینی، گندم و لوبیا، توسط Roach و Barcla (۱۹۴۶) گزارش شده است. به گزارش Gheibi و همکاران (۲۰۰۹) رشد گیاهان در شرایط گلخانه و کشت‌بافت، به‌ویژه زمانی که با اوره تغذیه می‌شوند، تحت تأثیر تغذیه نیکل می‌باشد. نیکل از جمله فلزات سنگین است که علی‌رغم ضروری بودن برای گیاهان، در غلظت‌های بالا ایجاد سمیت می‌کند. Fuentes و همکاران (۲۰۰۶) بیان داشتند که غلظت‌های بالای این عنصر از طریق کاهش وزن تر و خشک برگ‌ها و شاخساره، همچنین تأثیر منفی بر طول شاخساره موجب کاهش رشد عمومی گیاهان می‌گردد (Yang et al., 1996).

تأثیر مثبت کاربرد نیکل بر فعالیت آنزیم اوره‌آز و در نتیجه افزایش کارایی استفاده از اوره به عنوان منبع تغذیه نیتروژن در گیاه، در مطالعات قبلی به‌طور گسترده مورد بررسی قرار گرفته است اما اطلاعات زیادی در ارتباط با تأثیر تغذیه نیکل بر فعالیت دیگر آنزیم‌های چرخه نیتروژن در گیاه وجود ندارد. آنزیم گلوتامین سنتتاز (GS) از مهم ترین آنزیم‌هایی است که در جذب آمونیوم در گیاهان نقش دارد (Bashan, 2008). این آنزیم، آمونیوم حاصل از هیدرولیز اوره و کاهش نترات را به گلوتامین تبدیل می‌کند. فعالیت این آنزیم شدیداً وابسته به غلظت آمونیوم است (Stitt, 1999). با توجه به نقش نیکل در هیدرولیز اوره و افزایش غلظت آمونیوم در گیاه، به نظر می‌رسد تغذیه نیکل بر فعالیت آنزیم GS تأثیر داشته باشد.

مطالعات نشان داده است که افزایش فعالیت اوره‌آز در حضور اوره ناشی از آن است که اوره به عنوان بستره واکنش این آنزیم عمل می‌کند. در این مطالعه فرض شد که استفاده از اوره در ترکیب با نیکل ممکن است باعث افزایش تأثیر مثبت نیکل در مقایسه با دیگر نمک‌های نیکل شود. بنابراین، این مطالعه با هدف سنتز کمپلکس نیکل اوره و بررسی کارایی آن

### ستز کمپلکس نیکل-اوره: به منظور ستز کمپلکس

های نیکل-اوره، در یک بالن مجهز به همزن مغناطیسی، مقدار مشخصی نمک کلریدنیکل در آب مقطر حل گردیده و ضمن هم زدن محلول نمک فلزی، محلول اوره در فاصله‌های زمانی معین، قطره قطره به آن افزوده شد. مخلوط واکنش به مدت زمان معین در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس هم زده شده و در این فاصله به منظور ثابت نگه‌داشتن حجم محلول، عمل رفلاکس نیز انجام شد. سپس حلال واکنش تبخیر و رسوب ایجاد شده در دمای محیط خشک گردید. به منظور خالص‌سازی کمپلکس‌های نیکل اوره، رسوب حاصل چند بار با حلال آلی شسته و سپس در دمای محیط خشک شد.

### بررسی ویژگی‌های کمپلکس نیکل-اوره: به منظور

تعیین کارایی تولید کمپلکس‌های نیکل-اوره، کمپلکس‌های خالص شده با استفاده از پمپ خلأ و حمام روغن در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت یک ساعت خشک گردیده و در نهایت وزن خشک آنها اندازه‌گیری شد.

### تجزیه عنصری کمپلکس نیکل-اوره توسط دستگاه

جذب‌اتمی (Ray leigh wfx-210) و بررسی طیف‌های IR با استفاده از دستگاه FT-IR JASCO 680-PLUS توسط قرص KBr انجام شد. تجزیه عنصری کمپلکس نیکل-اوره توسط دستگاه جذب‌اتمی (Ray leigh wfx-210) نشان داد که غلظت نیکل در این کمپلکس ۲۵ میکرومول در لیتر است طیف‌های FT-IR لیگاند اوره آزاد و کمپلکس نیکل-اوره ساخته شده، توسط قرص KBr نشان داد که اوره به صورت لیگاند دو دندانه‌ای (گروه‌های عاملی کربونیل و آمید) عمل کرده و کمپلکس‌های نیکل-اوره را تشکیل می‌دهند.

### غلظت نیکل: به یک گرم از نمونه‌های گیاهی

شاخساره پودر شده ۵ میلی‌لیتر اسیدنیتریک غلیظ اضافه و پس از قرارگیری به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط، ۲ میلی‌لیتر آب اکسیژنه به آن افزوده شد. مجدداً نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط قرار گرفته، ۳ میلی‌لیتر آب مقطر به آنها اضافه و به مدت ۴۰ دقیقه در دستگاه

مایکروویو هضم شدند. پس از صاف کردن نمونه‌های هضم شده توسط کاغذ صافی واتمن ۴۲، عصاره حاصل به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد و غلظت نیکل توسط دستگاه جذب اتمی تعیین گردید (USEPA, 1995).

### غلظت اوره: برای اندازه‌گیری غلظت اوره شاخساره،

از روش عصاره‌گیری با آب داغ استفاده شد. مقدار ۰/۱ گرم ماده خشک شاخساره گیاه درون لوله آزمایش قرار داده و پس از اضافه کردن ۵ میلی‌لیتر آب مقطر به آن، به مدت ۵ دقیقه جوشانده شد. به منظور رسوب پروتئین‌ها، نمونه‌ها به مدت ۶۰ دقیقه با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس مقدار جذب محلول رویی در طول موج ۶۲۰ نانومتر توسط دستگاه طیف‌سنج اندازه‌گیری شد.

### فعالیت آنزیم اوره‌آز شاخساره: به منظور اندازه

گیری فعالیت آنزیم اوره‌آز، پس از برداشت شاخساره گیاه، نمونه‌ها هوا خشک شده و از الک ۰/۵ میلی‌متر عبور داده شدند. مقدار ۰/۲ گرم نمونه گیاهی در لوله فالکون ریخته و سپس بافر تریس (pH = ۷/۵) و محلول اوره به آن اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در انکوباتور قرار داده شدند. پس از آن بلافاصله ۳۵ میلی‌لیتر محلول کلریدپتاسیم-سولفات نقره به نمونه‌ها اضافه و پس از مخلوط شدن و سرد شدن در دمای محیط، با استفاده از محلول کلریدپتاسیم-سولفات نقره به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شدند. در نهایت ۲۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون به ظرف مخصوص دستگاه تقطیر با بخار آب منتقل و با اضافه کردن اکسیدمنیزیم به آن، تقطیر به مدت ۴ دقیقه انجام شد. آمونیوم متصاعد شده توسط مخلوط معرف بروم‌کروزول‌گرین و متیل‌رد جمع‌آوری و با محلول اسیدسولفوریک ۰/۰۰۵ مولار تیترو گردید. در نهایت فعالیت آنزیم اوره‌آز بر حسب میلی‌گرم آمونیوم بر کیلوگرم وزن خشک در ساعت محاسبه و گزارش شد (Frankenberger and Tabatabai, 1982).

### غلظت نیترات و آمونیوم: برای اندازه‌گیری غلظت

نیترات و آمونیوم ۲/۵ گرم نمونه گیاهی شاخساره و ۲۵ میلی

توسط دستگاه طیف‌سنج اندازه‌گیری و فعالیت آنزیم GS بر حسب  $\text{Unit ml}^{-1}$  گزارش شد.

**تجزیه و تحلیل آماری:** این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی به صورت فاکتوریل با سه تکرار (هر تکرار ۳ گیاه) در محیط آبکشت انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون LSD در سطح ۵ درصد انجام شد.

### نتایج و بحث:

**وزن تر شاخساره:** نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر اصلی رقم و منبع نیکل و همچنین اثر متقابل آنها بر عملکرد وزن تر شاخساره کاهو معنی‌دار است (جدول ۱). تأثیر تغذیه‌برگی نیکل بر افزایش عملکرد وزن تر شاخساره بسته به رقم و منبع تغذیه‌برگی نیکل متفاوت بود (شکل ۱). در رقم کونکواستادر، اختلاف معنی‌داری بین دو منبع تغذیه‌برگی نیکل، به لحاظ وزن تر شاخساره، وجود نداشت، اما در رقم گریزلی تأثیر تغذیه‌برگی کلریدنیکل بر افزایش وزن تر شاخساره به طور معنی‌داری بیشتر از کمپلکس نیکل-اوره بود. تغذیه‌برگی اوره، تأثیر معنی‌داری بر وزن تر شاخساره دو رقم کاهو نداشت. تأثیر مثبت تغذیه نیکل بر افزایش عملکرد بسیاری از گیاهان نظیر گوجه‌فرنگی (Nicoulaud and Bloom, 1998)، گندم، لوبیا (Roach and Barclay, 1946)، کاهو (Khoshgoftarmanesh *et al.*, 2011) و خیار (Khoshgoftarmanesh and Bahmanziyari, 2012) گزارش شده است. نیکل به عنوان یکی از عناصر ضروری کم‌مصرف، در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاه مانند سنتز پروتئین‌ها نقش دارد. بنابراین یکی از دلایل افزایش عملکرد گیاهان تیمار شده با نیکل می‌تواند ناشی از نقش مستقیم این عنصر در تحریک رشد گیاه باشد (Singhet *et al.*, 2011). از سوی دیگر، نیکل جزء ساختاری آنزیم اوره‌آز بوده و از طریق افزایش فعالیت آنزیم اوره‌آز و هیدرولیز اوره باعث بهبود متابولیسم نیتروژن

لیتر کلریدپتاسیم ۲ مولار به مدت یک ساعت تکان داده شد و پس از صاف کردن به کمک کاغذ صافی واتمن ۴۲، مقدار آمونیوم و نترات نمونه‌ها با استفاده از روش تقطیر با بخار آب اندازه‌گیری گردید (Keeny and Nelson, 1982). در این روش نیتروژن معدنی توسط معرف حاوی اسیدبوریک، برموکروزول‌گرین و متیل‌رد جمع‌آوری و توسط اسیدسولفوریک ۰/۰۰۵ نرمال تیترو گردید. برای اندازه‌گیری نیتروژن معدنی کل (نترات و آمونیوم) و نیتروژن آمونیومی به ترتیب از مجموع پودر اکسیدمنیزیم- دواردا و پودر اکسیدمنیزیم تنها، استفاده شد.

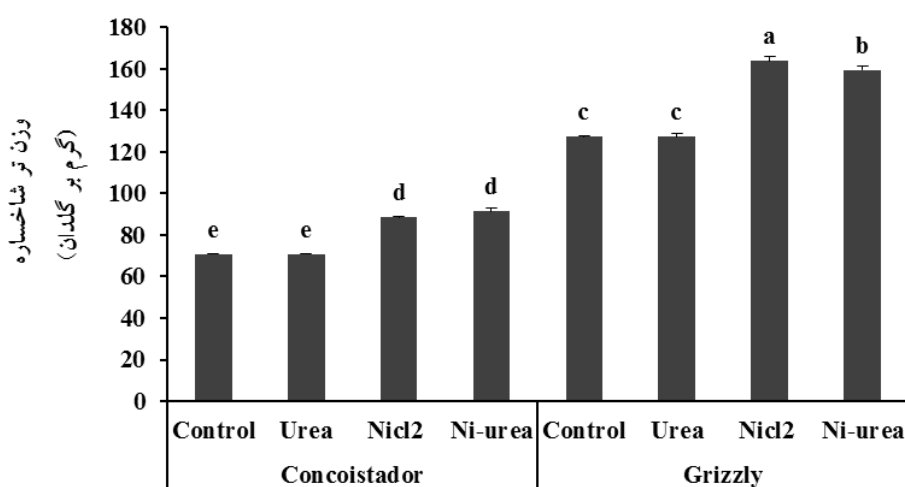
**فعالیت آنزیم گلوتامین سنتتاز (GS):** مقدار ۰/۲ گرم بافت تازه گیاهی شاخساره توسط نیتروژن مایع آسیاب شده و سپس بافر تریس-اسیدهیدروکلریک ۵۰ میلی‌مولار ( $\text{pH}=7/6$ ) که شامل EDTA ۱ میلی‌مولار، مرکاپتانول ۱۰ میلی‌مولار، دی‌تیوتیتول ۱ میلی‌مولار، کلریدمنیزیم ۱ میلی‌مولار و پلی‌وینیل‌پلی‌پیرولیدون ۰/۵ درصد به آن اضافه گردید. سپس نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه با دور  $\times g$  ۱۴۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. محلول صاف رویی برای سنجش فعالیت GS استفاده شد.

**فعالیت آنزیم GS براساس روش تغییر یافته Agbaria و همکاران (۱۹۹۸)** اندازه‌گیری شد. برای این منظور ۱/۲ میلی‌لیتر مخلوط بافر تریس-اسیدهیدروکلریک ۵۰ میلی‌مولار ( $\text{pH}=7/6$ )، آدنوزین‌دی‌فسفات (ADP) ۱ میلی‌مولار، گلوتامین ۵۰ میلی‌مولار، کلریدمنیزیم ۲۰ میلی‌مولار، آرسنات سدیم ۲۰ میلی‌مولار، به عصاره آنزیم افزوده و واکنش با اضافه کردن هیدروکسیل‌آمین ۱۳ میلی‌مولار شروع شد. نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سلسیوس نگهداری و سپس ۱/۸ میلی‌لیتر محلول سولفات آهن- اسیدسولفوریک و ۰/۱۵ میلی‌لیتر محلول مولیدات آمونیوم-اسیدسولفوریک به عنوان متوقف‌کننده به آن اضافه شد. به منظور رسوب پروتئین‌های گیاهی، نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. مقدار جذب محلول رویی در طول موج ۶۶۰ نانومتر

جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر منبع نیکل و رقم بر عملکرد وزن تر و خشک، غلظت نیترات، آمونیوم، اوره و نیکل و فعالیت آنزیم اوره‌آز و گلوتامین سنتتاز شاخساره کاهو.

| منابع تغییرات   | درجه آزادی | وزن تر شاخساره       | وزن خشک شاخساره     | غلظت نیترات         | غلظت آمونیوم        | غلظت نیکل           | غلظت اوره             | میانگین مربعات        |                       |
|-----------------|------------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
|                 |            |                      |                     |                     |                     |                     |                       | آنزیم گلوتامین سنتتاز | آنزیم اوره‌آز         |
| رقم             | ۱          | ۲۹۳۵۸ <sup>***</sup> | ۰/۵۹۸ <sup>**</sup> | ۲/۰۷ <sup>*</sup>   | ۲۸۸۸۷ <sup>**</sup> | ۷۰/۰ <sup>***</sup> | ۳۰۹۱۴۵ <sup>***</sup> | ۱/۲۵ <sup>***</sup>   | ۳۰۹۱۴۵ <sup>***</sup> |
| منبع نیکل       | ۳          | ۱۴۳۲ <sup>***</sup>  | ۱۵/۵ <sup>***</sup> | ۶/۱۹ <sup>***</sup> | ۶۱۶ <sup>***</sup>  | ۶۲۸ <sup>***</sup>  | ۲۷۸۴۶ <sup>***</sup>  | ۲/۷۰ <sup>***</sup>   | ۲۷۸۴۶ <sup>***</sup>  |
| رقم × منبع نیکل | ۳          | ۱۲۸ <sup>***</sup>   | ۰/۴۲۸ <sup>**</sup> | ۰/۰۳۱               | ۱۵۷ <sup>**</sup>   | ۳۱/۵ <sup>***</sup> | ۱۱۰۰۴ <sup>***</sup>  | ۰/۳۰۶ <sup>**</sup>   | ۱۱۰۰۴ <sup>***</sup>  |
| خطا             | ۱۶         | ۵/۸۳                 | ۰/۰۸                | ۰/۴۰۶               | ۲۲/۶                | ۰/۶۶۶               | ۱۵۶                   | ۰/۰۳۹                 | ۱۵۶                   |
| ضریب تغییرات    | -          | ۲/۲۱                 | ۳/۷۹                | ۱۲/۷                | ۴/۸۴                | ۷/۱۲                | ۵/۸۷                  | ۱۷/۳                  | ۵/۸۷                  |

\*\*\* و \*\* به ترتیب بیانگر معنی‌دار بودن در سطح آماری ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ می‌باشند.



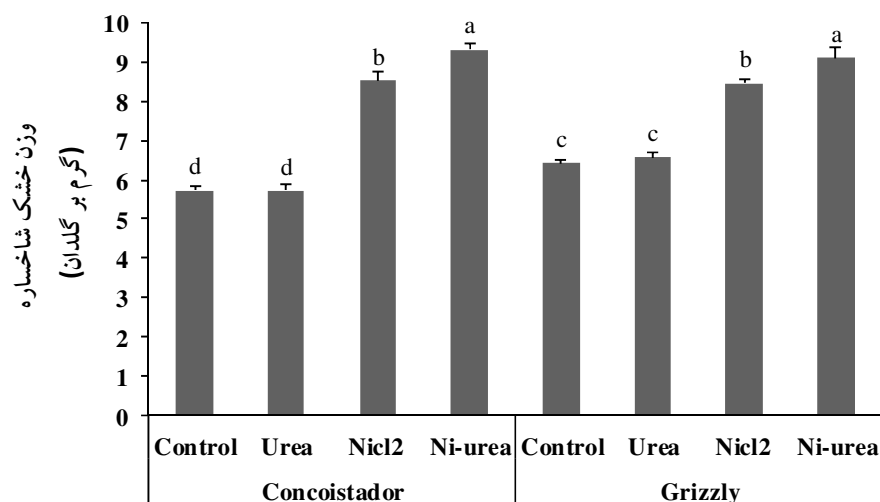
شکل ۱- تأثیر تغذیه‌برگی نیکل بر وزن تر شاخساره دو رقم کاهو. ستون‌های دارای حروف یکسان تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری در سطح ۵ درصد آزمون LSD ندارند.

Gheibi و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند که افزودن ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر نیکل به محلول‌غذایی، صرف نظر از منبع نیتروژن، سبب افزایش عملکرد وزن خشک ریشه ذرت شد. Gad و همکاران (۲۰۰۷) با بررسی تأثیر سطوح مختلف نیکل بر رشد و عملکرد گیاه گوجه‌فرنگی نشان دادند که کاربرد ۱۵ و ۳۰ میلی‌گرم نیکل در کیلوگرم یک خاک آهکی سبب افزایش معنی‌دار وزن خشک ریشه و شاخساره گیاه شد.

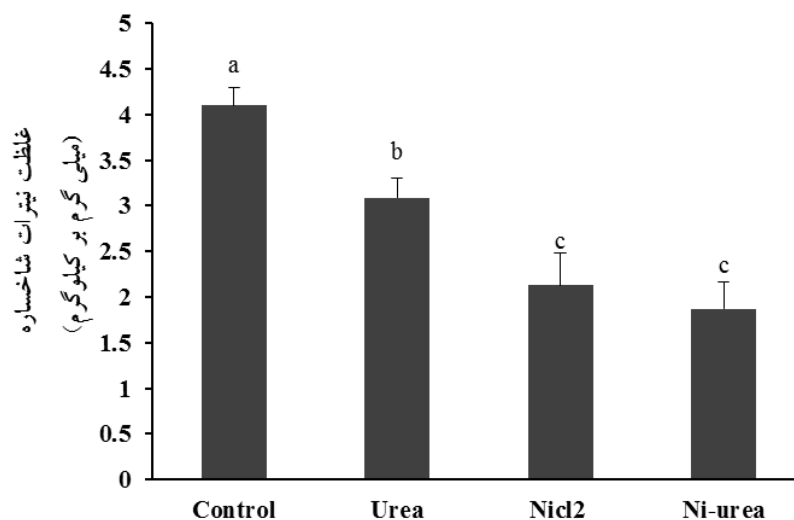
**غلظت نیترات شاخساره:** تغذیه‌برگی اوره و نیکل در مقایسه با تیمار شاهد باعث کاهش معنی‌دار غلظت نیترات

و افزایش عملکرد گیاه می‌شود (Dixon et al., 1975).

**وزن خشک شاخساره:** تغذیه‌برگی نیکل سبب افزایش عملکرد وزن خشک شاخساره دو رقم کاهو گردید (شکل ۲). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که در هر دو رقم، تأثیر تغذیه برگی کمپلکس نیکل-اوره بر افزایش عملکرد وزن خشک شاخساره به طور معنی‌داری بیشتر از کلریدنیکل بود. تغذیه-برگی اوره، تأثیر معنی‌داری بر وزن خشک شاخساره دو رقم کاهو نداشت. نتایج به دست آمده از این پژوهش با نتایج مطالعات دیگر پژوهشگران هم‌خوانی دارد. در این ارتباط



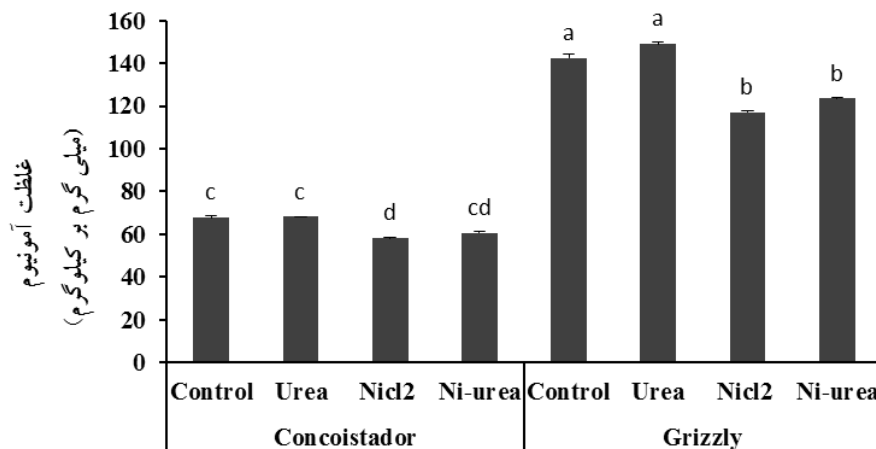
شکل ۲- تأثیر تغذیه‌برگی نیکل بر وزن خشک شاخساره دو رقم کاهو. ستون‌های دارای حروف یکسان تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری در سطح ۵ درصد آزمون LSD ندارند.



شکل ۳- تأثیر تغذیه‌برگی نیکل بر غلظت نیترات شاخساره کاهو. ستون‌های دارای حروف یکسان تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری در سطح ۵ درصد آزمون LSD ندارند.

به دلیل اثر مثبت نیکل بر آنزیم‌های درگیر در کاهش (احیای) نیترات باشد. نتایج به دست آمده از این پژوهش با نتایج مطالعات دیگر پژوهشگران هم‌خوانی دارد. نتایج به دست آمده توسط Tabatabaei (۲۰۰۹) در ارتباط با بررسی تأثیر منبع نیتروژن و کاربرد نیکل بر کیفیت خیار

شاخساره دو رقم مورد مطالعه شد (شکل ۳). در هر دو رقم غلظت نیترات شاخساره گیاهان تیمار شده با کلرید نیکل و کمپلکس نیکل- اوره کمتر از اوره بود، اما از این نظر اختلاف معنی‌داری بین دو منبع نیکل مشاهده نشد. کاهش غلظت نیترات شاخساره در حضور نیکل می‌تواند



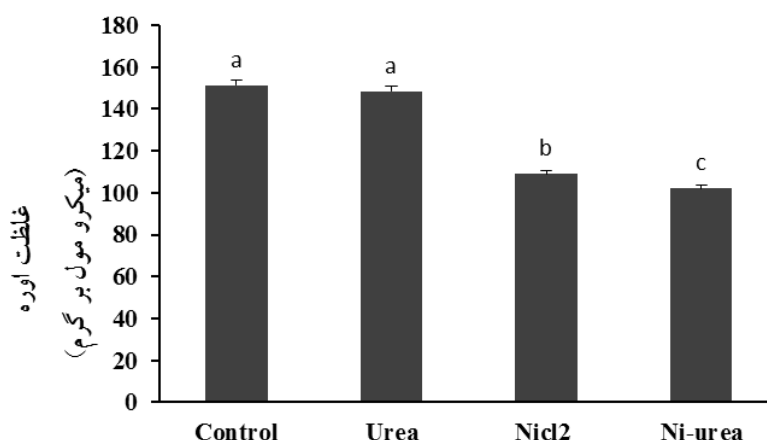
شکل ۴- تأثیر تغذیه‌برگی نیکل بر غلظت آمونیوم شاخساره دو رقم کاهو. ستون‌های دارای حروف یکسان تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری در سطح ۵ درصد آزمون LSD ندارند.

اما از این نظر اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای تغذیه‌برگی اوره و شاهد مشاهده نشد (شکل ۴). به طور کلی غلظت آمونیوم شاخساره رقم گریزلی به طور معنی‌داری بیشتر از رقم کونکوایستادر بود. در این راستا، Eskew و همکاران (۱۹۸۴) با انجام مطالعه‌ای بر روی گوجه‌فرنگی مشاهده کردند که در گیاهان مبتلا به کمبود نیکل، نیترات و آمونیوم در گیاه انباشته شد. این پژوهشگران همچنین دریافتند که تغذیه نیکل باعث کاهش معنی‌دار غلظت آمونیوم و نیترات شاخساره شد.

**غلظت اوره شاخساره:** نتایج این مطالعه نشان داد که تغذیه‌برگی نیکل، باعث کاهش معنی‌دار غلظت اوره شاخساره شد و از این نظر اختلاف معنی‌داری بین کلرید نیکل و کمپلکس نیکل-اوره وجود نداشت (شکل ۵). تأثیر تغذیه‌برگی کمپلکس نیکل-اوره بر کاهش غلظت اوره شاخساره به طور معنی‌داری بیشتر از کلرید نیکل بود. در هر دو رقم، تغذیه‌برگی اوره تأثیر معنی‌داری بر غلظت اوره شاخساره گیاهان نداشت. در ارتباط با تأثیر تغذیه نیکل بر غلظت اوره در گیاه، Shimada و Ando (۱۹۸۰) مشاهده کردند که کمبود نیکل سبب انباشتگی اوره و ایجاد نقاط بافت‌مرده در حاشیه برگ سویا و گوجه‌فرنگی رشد یافته در محلول‌های غذایی حاوی اوره شد. همچنین آنها

نشان داد که غلظت نیترات در گیاهان رشد کرده در محلول غذایی حاوی نیترات بیشتر از بوته‌های رشد کرده در محلول غذایی حاوی اوره بود و با افزایش غلظت نیکل، غلظت نیترات میوه کاهش یافت. بر اساس نتایج مطالعات Brown و همکاران (۱۹۹۰)، نیکل از طریق تحریک سوخت و ساز نیتروژن و فرآیند ساخت پروتئین، از انباشتگی نیترات در گیاه جلوگیری می‌کند. این پژوهشگران نشان دادند که کمبود نیکل بر فعالیت آنزیم‌های درگیر در واکنش کاهش نیترات نیز موثر است. تأثیر تغذیه نیکل بر افزایش فعالیت نیترات‌ریداکتاز و جلوگیری از انباشتگی نیترات در ریشه کاهو توسط Matraszek (۲۰۰۸) گزارش شده است. در مطالعه‌ای که توسط Atta-Aly (۱۹۹۰) بر روی اثر تغذیه نیکل بر کیفیت برگ‌های جعفری صورت گرفت، نشان داده شد که افزودن سطوح پایین کود سولفات نیکل به یک خاک رسی سبب کاهش غلظت نیترات برگ جعفری شد. این امر باعث افزایش کیفیت محصول و در نتیجه کاهش خطر سمیت نیترات برای انسان به ویژه کودکان و افراد پیر می‌گردد.

**غلظت آمونیوم شاخساره:** تغذیه‌برگی نیکل، باعث کاهش غلظت آمونیوم شاخساره دو رقم مورد مطالعه شد،



شکل ۵- تأثیر تغذیه‌برگی نیکل بر غلظت اوره شاخساره کاهو. ستون‌های دارای حروف یکسان تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری در سطح ۵ درصد آزمون LSD ندارند.

میلی‌گرم در کیلوگرم وزن خشک تخمین زده شد (Brown *et al.*, 1987). در گونه‌های گیاهی حساس و به نسبت متحمل در صورتی که غلظت نیکل به ترتیب بیشتر از ۱۰ و ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن خشک باشد، رشد ریشه و شاخساره بدون ایجاد نشانه‌های ظاهری کاهش می‌یابد (Gerenda's and Sattelmacher, 1997). با توجه به نتایج به دست آمده، بیشترین غلظت نیکل (۲۴ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن خشک) در رقم گریزلی تیمار شده با کمپلکس نیکل- اوره مشاهده شد. این گیاهان نه تنها نشانه‌های سمیت نیکل (زردبرگی و کاهش رشد) را نشان ندادند بلکه رشد و عملکرد آنها افزایش یافت. بنابراین می‌توان گفت غلظت نیکل استفاده شده برای رشد کاهو در حد بهینه بوده است.

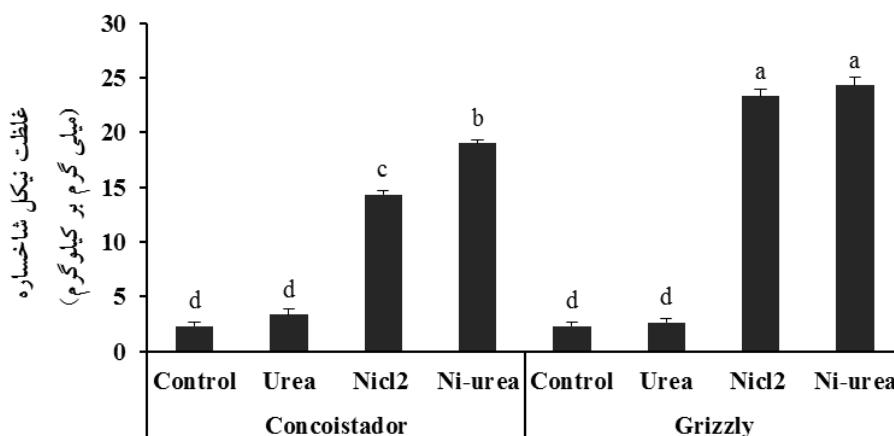
**فعالیت آنزیم اوره‌آز:** تغذیه‌برگی نیکل، باعث افزایش فعالیت آنزیم اوره‌آز شاخساره دو رقم مورد مطالعه شد (شکل ۷). تأثیر مثبت تغذیه‌برگی نیکل بر فعالیت آنزیم اوره‌آز شاخساره بسته به منبع نیکل متفاوت بود، به‌طوری‌که فعالیت آنزیم اوره‌آز شاخساره گیاهان تیمار شده با کمپلکس نیکل-اوره در هر دو رقم به‌طور معنی‌داری بیشتر از کلرید نیکل بود. تغذیه برگی اوره تأثیر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم اوره‌آز شاخساره کاهو نداشت. اوره‌آز یک آنزیم وابسته به فلز

دریافتند که تغذیه نیکل از طریق افزایش فعالیت آنزیم اوره‌آز برگ سبب جلوگیری از انباشتگی اوره شد. همچنین Bahmanziyari و Khoshgoftarmanesh (۲۰۱۲) نشان دادند که کاربرد نیکل صرف‌نظر از منبع نیتروژن (نترات- آمونیوم یا اوره) سبب کاهش معنی‌دار غلظت اوره شاخساره دو رقم خیار شد.

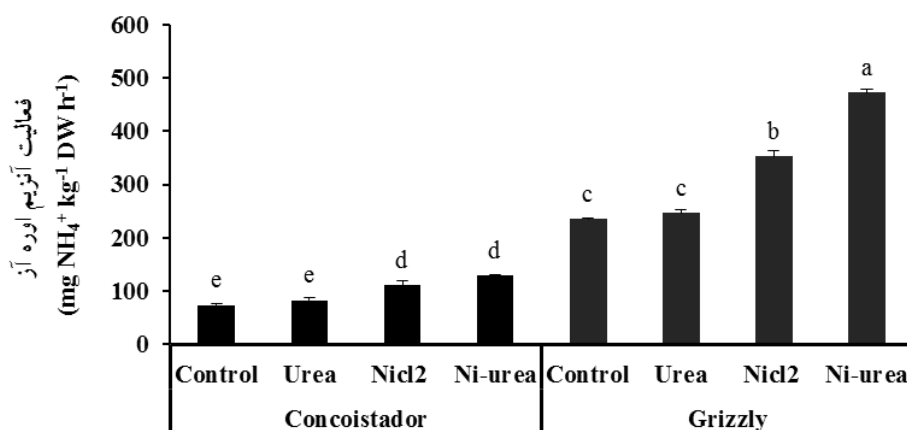
#### غلظت نیکل شاخساره: تغذیه‌برگی نیکل، باعث

افزایش غلظت نیکل شاخساره دو رقم مورد مطالعه شد، در حالی‌که از این نظر اختلاف معنی‌داری بین تیمار تغذیه‌برگی اوره و تیمار شاهد مشاهده نشد (شکل ۶). تأثیر مثبت تغذیه‌برگی نیکل بر افزایش غلظت نیکل شاخساره بسته به رقم و منبع نیکل متفاوت بود. به طور کلی غلظت نیکل شاخساره رقم کونکوایستادر تیمار شده با کمپلکس نیکل-اوره بیشتر از کلریدنیکل بود اما در رقم گریزلی، از این نظر اختلاف معنی‌داری بین دو منبع نیکل مشاهده نشد. گستره غلظت بهینه نیکل در گیاه بین ۰/۰۱ تا ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم گزارش شده است (Gerendes *et al.*, 1999). حد بحرانی نیکل برای جوانه‌زنی بذر جو، رشد شاخساره در یولاف، جو و گندم و همچنین برای رشد شاخساره در گیاهانی که از اوره به عنوان منبع نیتروژن بهره می‌برند از قبیل گوجه‌فرنگی، برنج و کدومسمایی در حدود ۱۰۰





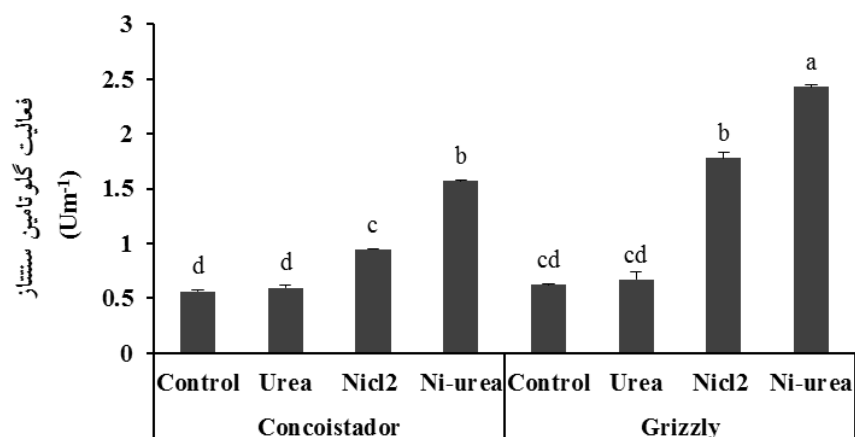
شکل ۶- تأثیر تغذیه‌برگی نیکل بر غلظت نیکل شاخساره دو رقم کاهو. ستون‌های دارای حروف یکسان تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری در سطح ۵ درصد آزمون LSD ندارند.



شکل ۷- تأثیر تغذیه‌برگی نیکل بر فعالیت آنزیم اوره‌آز شاخساره دو رقم کاهو. ستون‌های دارای حروف یکسان تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری در سطح ۵ درصد آزمون LSD ندارند.

مسمایی (Gerenda's and Sattelmacher, 1997)، برنج و کلزای (Gerendas *et al.*, 1998) تغذیه شده با اوره را گزارش کردند. Khoshgoftarmanesh و همکاران (۲۰۱۱) دریافتند که افزودن نیکل به محلول غذایی حاوی اوره، فعالیت آنزیم اوره‌آز برگ کاهو را بین ۱/۵ تا ۳ برابر در مقایسه با تیمار بدون نیکل افزایش داد. در حالی که در گیاهان رشد کرده در محلول غذایی دارای نیترات آمونیوم، افزودن نیکل تأثیر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم اوره‌آز شاخساره نداشت. فعالیت آنزیم گلوتامین سنتتاز (GS): تغذیه‌برگی

نیکل بوده (Agnieszka and Brookzik, 2000) و تغذیه نیکل باعث افزایش فعالیت این آنزیم و در نتیجه افزایش کارایی استفاده از اوره به عنوان منبع تغذیه نیتروژن در گیاه می‌گردد (Dixon *et al.*, 1975). Eskew و همکاران (۱۹۸۳) نشان دادند که کاربرد ۱ تا ۱۰۰ میکروگرم در لیتر نیکل، سبب افزایش فعالیت آنزیم اوره‌آز و جلوگیری از ایجاد لکه‌های بافت مرده در حاشیه برگ سویا ناشی از انباشتگی اوره گردید. Gerendes و همکاران در سال‌های ۱۹۹۷ تا ۱۹۹۹ تأثیر کمبود نیکل بر رشد تنباکو، کدو



شکل ۸ - تأثیر تغذیه‌برگی نیکل بر فعالیت آنزیم گلوتامین سنتتاز شاخساره دو رقم کاهو. ستون‌های دارای حروف یکسان تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری در سطح ۵ درصد آزمون LSD ندارند.

حاصل از کاهش نیترات و هیدرولیز اوره را به آمینواسیدها تبدیل کرده و باعث کاهش غلظت آمونیوم در گیاه می‌شود.

#### نتیجه‌گیری:

نتایج این مطالعه نشان داد که تغذیه‌برگی نیکل صرف نظر از منبع مصرفی، کلریدنیکل یا کمپلکس نیکل-اوره، با بهبود متابولیسم نیتروژن، افزایش عملکرد کاهو در محلول غذایی حاوی اوره را به همراه داشت. تأثیر تغذیه‌برگی نیکل در افزایش وزن تر شاخساره در رقم کونکوایستادر و گریزلی به ترتیب ۲۷/۲ و ۲۶/۷۴ درصد نسبت به گیاهان شاهد بود. کارایی تغذیه‌برگی کمپلکس نیکل-اوره در افزایش غلظت نیکل شاخساره دو رقم کاهو بیشتر از کلرید نیکل بود. تغذیه نیکل نیز از طریق افزایش فعالیت آنزیم اوره‌آز مانع از انباشتگی اوره شاخساره شد. بر اساس نتایج این مطالعه، نیکل از طریق تأثیر بر فعالیت آنزیم GS نیز می‌تواند باعث بهبود متابولیسم نیتروژن و جلوگیری از انباشتگی آمونیوم در گیاهان شود. همچنین در هر دو رقم، غلظت نیترات شاخساره گیاهان تغذیه شده با نیکل به طور معنی‌داری کمتر از تیمار شاهد بود. این مسأله ممکن است به علت تأثیر نیکل بر فعالیت آنزیم‌های کاهنده نیترات باشد. بنابراین لازم است این فرضیه در مطالعات دیگر مورد بررسی قرار گیرد.

نیکل، سبب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم GS شاخساره دو رقم مورد مطالعه شد (شکل ۸). در هر دو رقم کاهو، تأثیر کمپلکس نیکل-اوره بر افزایش فعالیت آنزیم GS شاخساره بیشتر از کلریدنیکل بود. تغذیه‌برگی اوره تأثیر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم GS شاخساره نسبت به گیاهان شاهد نداشت. گلوتامین سنتتاز یکی از آنزیم‌های کلیدی در جذب آمونیوم در گیاهان عالی به شمار می‌رود که با مصرف ATP، آمونیوم و گلوتامات را به گلوتامین تبدیل می‌کند (Bashan et al., 2008). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تغذیه‌برگی نیکل باعث افزایش فعالیت آنزیم GS شد. در واقع، نیکل از طریق افزایش فعالیت آنزیم اوره‌آز باعث هیدرولیز اوره و تولید آمونیوم، به عنوان بستره فعالیت آنزیم GS شده است. فعالیت GS وابسته به غلظت بستره بوده و با افزایش غلظت آمونیوم در گیاه، فعالیت این آنزیم افزایش می‌یابد. مطالعات Arkoun و همکاران (۲۰۱۳) نشان داد که کمبود نیکل و وجود عوامل بازدارنده فعالیت آنزیم اوره‌آز باعث کاهش فعالیت آنزیم GS در گندم شد. همچنین Lasa و همکاران (۲۰۰۱) گزارش کردند که افزایش غلظت آمونیوم در گیاه باعث بهبود فعالیت GS می‌شود. در این مطالعه، افزایش فعالیت آنزیم GS در گیاهان تغذیه شده با نیکل، مانع از انباشتگی آمونیوم در شاخساره دو رقم کاهو شد. در واقع آنزیم GS آمونیوم

- aspects of tomato plants. Australian Journal of Basic and Applied Sciences 1: 286-293.
- Gerenda's, J. and Sattelmacher, B. (1997) Significance of Ni supply for growth, urease activity and the contents of urea, amino acids and mineral nutrients of urea-grown plants. Plant and Soil 190:153-162.
- Gerendes, J., Polacco, J. C., Freyermuth, S. K. and Sattlmachr, B. (1999) Significannce of nickel for plant growth and metabolism. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 162: 241-256.
- Gerendas, J., Zhu, Z. and Sattelmacher, B. (1998) Influence of N and Ni supply on nitrogen metabolism and urea activity in rice (*Oryza sativa* L.). Journal of Experimental Botany 49: 1545-1554.
- Gheibi ,M. N., Kholdebarin, B., Malakouti, M. J., Ghanati., F., Teimouri, S. and Sayadi R. (2011) Effect of various nickel levels on growth and chlorophyll content of corn plants supplied with urea and ammonium nitrate. Journal of Food, Agriculture and Environment 9: 583 - 587.
- Gheibi, M. N., Malakouti, M. J., Kholdebarin, B., Ghanati, F., Teimouri, S. and Sayadi, R. (2009) Significance of nickel supply for growth and chlorophyll content of wheat supplied whit urea or ammonium nitrate. Journal of Plant Nutition. 32: 1440-1450.
- Hirel, B. and Lea, P. J. (2001) Ammonium assimilation. In: Plant Nitrogen (Eds. Lea, P. J. and Morot-Gaudry, J. F.) pp. 79-99. INRA Springer-Verlag, Berlin.
- Keeny, D. R. and Nelson, D. W. (1982) Inorganic forms of nitrogen, In: Methods of Soil Analysis, Part 2 (Ed. Black, C. A.) pp. 643-698. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA.
- Khoshgoftarmanesh, A. H., Hosseini, F. and Afyuni, M. (2011) Nickel supplementation effect on the growth, urease activity and urea and nitrate concentrations in lettuce supplied with different nitrogen sources. Scientia Horticulture 130: 381-85.
- Khoshgoftarmanesh, A. H. and Bahmanziyari H., (2012) Stimulating and toxicity effects of nickel on growth, yield and some fruit quality attributes of cucumber supplied with different nitrogen sources. Scientia Horticulture. 175:474-81.
- Lasa B., Frechilla, S., Lamsfus, C. and Aparicio-Tejo, P. M. (2001). The sensitivity to ammonium nutrition is related to nitrogen accumulation. Scientia Horticulture. 91:143-152.
- Matraszek, R. (2008). Nitrate reductase activity of two leafy vegetables as affected by nickel and different nitrogen forms. Acta Physiologiae Plantarum 30:361-370.
- Nicoulaud, B. A. L. and Bloom, A. J. (1998) Nickel supplements improve growth when foliar urea is the sole nitrogen source for tomato. Jouurnal of
- Agbaria, H., Heuer, B. and Zieslin, N. (1998) Rootstock-imposed alterations in nitrate reductase and glutamine synthetase activities in leaves of rose plants. Biologia Plantarum 41: 85-91.
- Agnieszka, S. and Brookzik, R. (2000) Plant ureases: Roles and regulation. Acta Biochemica Polonica 4: 1189-1195.
- Arkoun, M., Jannin, L., Laine, P., Etienne, P., Garnica, M., Yvin, J. C. and Ourry, A. (2013) A physiological and molecular study of the effects of nickel deficiency and phenylphosphordiamidate (PPD) application on urea metabolism in oilseed rape (*Brassica napus* L.). Plant and Soil 362: 79-92.
- Atta-Aly, M. A. (1999). Effect of nickel addition on the yield and quality of parsley leaves. Scientia. Horticulture 82: 9-24.
- Bashan, E., Paola, M. D., Hani, A. and Bashan, Y. (2008) Role of glutamine dehydrogenase and glutamine synthetase in chlorella vulgaris assimilation of ammonium when Jointly immobilized with the microalgae-growth-promoting bacterium azospirillum brasilense. Journal of Phycology 44: 1188-1196.
- Brown, P. H., Welch, R. M. and Cary, E. E. (1987) Nickel: a micronutrient essential for higher plants. Plant Physiology 85: 801-803.
- Brown, P. H., Welch, R. M. and Madison, J. T. (1990) Effect of nickel deficiency on soluble anion, amino acid, and nitrogen levels in barley. Plant and Soil 125: 19-27.
- Dixon, N. E., Gazzola, C., Blakeley, R.L. and Zerner, B. (1975) Jack bean urease (EC 3.5.1.5). A metalloenzyme. A simple biological role for nickel. Journal of the American Chemical Society 97: 4131-4133.
- Eskew, D. L., R. M. Welch and W.A. Norvell. (1983) Nickel: an assential micronutrient for legumes and possibly all higher plants. Science 222: 1975- 1999.
- Eskew D. L., Welch, R. M. and Norvell, W. A. (1984) Nickel in higher plants. Further evidence for an essential role. Plant Physiolgy 76: 691-693.
- Frankenberger, W. T. and Tabatabai, M. A. (1982) Amidase & urease activity in plants. Plant and Soil. 64: 153-166.
- Fuentes, D., Disante, K. B., Valdecantos, A., Cortina, J. and Vallejo, V. R. (2006) Response of Pinushalepensis Mill. Seedlings to biosolids enriched with Cu, Ni and Zn in three Mediterranean forest soils. Environmental Pollution 1:1-8.
- Gad, N., EI-Sherif, M. H. and EI-Gereedly, N. H. M. (2007) Influence of nickel on some physiological

- Tabatabaei, S. J. (2009) A supplement of nickel affect yield, quality, and nitrogen metabolism when urea or nitrate is the sole nitrogen source for cucumber. *Journal of Plant Nutrition* 32: 713-724.
- USEPA (1995) Method 3051: Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils, and oils. Available online at <http://www.epa.gov/SW-846/pdfs/3051.pdf>. Accessed 22 July 2004.
- Wood, B. W., Reilly, C. C. and Nyczepir, A. P. (2004) Mouse-ear of pecan: A nickel deficiency. *Horticulture Science* 39: 1238-1242.
- Yang, X., Baligar, V. C., Martens, D. C. and Clark, R. B. (1996) Plant tolerance to Ni toxicity. Influx, transport and accumulation of Ni in four species. *Journal of Plant Nutrition* 19:73-85.
- American Society for Horticulture Science 123: 556- 559.
- Polacco, J. C. (1977) Nitrogen metabolism in soybean tissue culture: II, Urea utilization and urease synthesis requires  $Ni^{2+}$ . *Plant Physiology* 59: 827- 830.
- Roach, W. A. and Barclay, C. (1946) Nickel and multiple trace deficiencies in agricultural crops. *Nature* 157: 696.
- Shimada, N. and Ando, T. (1980) Role of nickel in plant nutrition. II. Effect of nickel on the assimilation of urea by plants. *Nippon Dojo Hiriyogaku Zasshi* 51: 493- 496.
- Singh, R. P., Chandel, S. K. S., Yadav, P. K. and Singh, S. N. (2011) Effect of Ni on nitrogen uptake and yield of wheat. (*triticum aestivum*). *Indian Journal of Scientific Research* 2: 61-63.
- Stitt, M. (1999) Nitrate regulation of metabolism and growth. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 178-186.