اثر سالیسیلیک اسید و سدیم نیترو پروساید بر رشد و محتوی عناصر ضروری گیاهچه‌های کلزای بهاره رقم PF تحت تنش نیکل

نادر کاظمی*[1]، رمضانعلی خاوری‌نژاد[2] و طاهر نژاد ستاری[2]

چکیده

این پژوهش با هدف بررسی اثر سالیسیلیک اسید و سدیم نیترو پروساید بر رشد و محتوی عناصر ضروری گیاهچه‌های کلزا تحت تنش نیکل در مجتمع آزمایشگاهی واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تهران انجام شد. برای این منظور اثر برهم کنش نیکل، سالیسیلیک اسید (SA) و سدیم نیترو پروساید (SNP) به عنوان دهنده‌ی نیتریک اکسید (NO) در کلزای (*Brassica napus* L.) رقم PF بررسی گردید. گیاهچه‌های ۲۱ روزه به مدت ده روز در معرض غلظت‌هایی از نیکل (شاهد و۰/۵ میلی مولار)، SA (شاهد و۰/۲ میلی‌مولار) و SNP (شاهد و۰/۲ میلی مولار) قرار گرفتند. علایم سمیت نیکل مانند کلروز و نکروز در برگ‌های گیاهچه‌های تحت تیمار نیکل مشاهده شد. تیمار با نیکل موجب کاهش وزن‌تر و خشک ریشه‌ها و اندام‌های هوایی شد. هم‌چنین محتوی عناصر معدنی (منیزیم، آهن، کلسیم، فسفر و پتاسیم) در ریشه‌ها و اندام‌های هوایی گیاهچه‌های کلزای تحت تیمار نیکل به شدت کاهش یافت. اما محتوی نیتروژن در ریشه‌های این گیاهچه‌ها افزایش و در اندام‌های هوایی کاهش یافت. تجمع نیکل در ریشه‌ها به مراتب بیشتر از بخش‌های هوایی گیاهچه بود. گیاهچه‌های تحت تنش نیکل که در معرض SA یا NO به‌ویژه SA + NO قرار گرفتند، در مقایسه با گیاهچه‌هایی که فقط تحت تاثیر تنش نیکل بودند، کاهش علایم سمیت و بهبود رشد را نشان دادند. در این گیاهچه‌ها SA یا NO و به‌ویژه برهم کنش این دو ماده موجب کاهش انتقال نیکل از ریشه به اندام‌های هوایی شده و محتوی عناصر معدنی را در تیمارهای نیکل افزایش دادند. این یافته‌ها نشان دادند که کاربرد SA یا NO به‌ویژه در حالت توام، با توقیف نیکل در ریشه‌ها و از طرف دیگر با بهبود تغذیه عناصر معدنی، به‌طور قابل توجهی موجب برطرف شدن اثر سمی نیکل در گیاهچه کلزا شده است.

واژه های کلیدی: کلزا، سمیت نیکل، سالیسیلیک اسید برون زا، نیتریک اکسید، تغذیه معدنی.

تاریخ دریافت: ۹۱/۲/۲ تاریخ پذیرش: ۹۱/۵/۲۳

۱- عضو هیأت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، گروه زیست شناسی، زنجان، ایران

***مسئول مکاتبات: nader.kazemi@azu.ac.ir**

۲- به ترتیب استاد و دانشیار گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران

مقدمه

امروزه با وجود آن که نیکل به مجموعه عناصر کم‌مصرف مورد نیاز گیاهان افزوده شده است و نقش آن در رشد و به‌ویژه فعالیت آنزیم اوره آز به اثبات رسیده است، ولی به عنوان یک فلز سنگین، در غلظت‌های بالا برای اکثر گونه‌های گیاهی سمی می‌باشد و بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی را تغییر می‌دهد (Seregin and Kozhevnikova, 2006). از مهم‌ترین علایم سمیت نیکل، کلروز و تشکیل بخش‌های سوختگی در برگ‌ها می‌باشد که معمولاً منجر به کاهش یا توقف رشد اندام هوایی و ریشه می‌شود (Pandey and Sharma, 2002). این علایم معمولاً ناشی از اختلال و عدم تعادل تغذیه معدنی گیاه می‌باشد. زیرا نیکل می‌تواند در جذب، انتقال طبیعی و تجمع عناصر ضروری گیاه اثر بگذارد (Stearns *et al.*, 2005). نیکل عمدتاً توسط فعالیت‌های انسان، مانند استخراج معدن، سوزاندن زغال سنگ، به کارگیری فاضلاب، استفاده از کودهای فسفاته و آفت‌کش‌ها وارد محیط زیست می‌گردد و یکی از فراوان‌ترین آلوده‌کننده‌های فلز سنگین خاک محسوب می‌شود (Gimeno-Garcia *et al.*, 1996).

سالیسیلیک اسید (SA) یک مولکول شاخص مهم در گیاهان است و تحمل گیاه به تنش‌های زیستی و غیرزیستی مختلف را افزایش می‌دهد (Horvath *et al.*, 2007). گزارش شده است که کاربرد سالیسیلیک اسید برونزا اثر مضر فلزات سنگین مانند کادمیوم (Metwally *et al.*, 2003)، جیوه (Zhou *et al.*, 2009) و نیکل (Kazemi *et al.*, 2010) را بهبود می‌بخشد. هم‌چنین سالیسیلیک اسید نقش مهمی در تنظیم تعدادی از فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاهان نظیر: رشد و نمو، جذب و انتقال یون و نفوذپذیری غشا ایفا می‌کند (Raskin, 1992). البته ذکر این نکته حایز اهمیت است که افزودن سالیسیلیک اسید به محیط رشد گیاهان مختلف در تنش‌های محیطی گوناگون همیشه باعث ایجاد مقاومت در گیاهان نمی‌شود، بلکه در بعضی از موارد ممکن است باعث تشدید آسیب نیز در گیاهان تحت تنش گردد (Horvath *et al.*, 2007). به نظر می‌رسد که نحوه‌ی اعمال تیمار سالیسیلیک اسید، غلظت به کار رفته و مرحله نموی گیاه در پاسخ‌های مشاهده شده موثر باشد (Metwally *et al.*, 2003).

نیتریک اکسید (NO) یک مولکول فعال زیستی است که نقش‌های مهمی در فرایندهای فیزیولوژیکی مختلف مانند رشد جوانه‌زنی و افزایش میزان کلروفیل (Lamattina *et al.*, 2003)، (Arasimowicz and Floryszak-Wieczorek, 2007) و پاسخ‌های سازگاری به تنش‌های محیطی ایفا می‌کند. در رابطه با تنش‌های غیرزیستی، نشان داده شده که کاربرد سدیم نیترو پروساید (SNP) به عنوان دهنده‌ی نیتریک اکسید اثرهای مضر شوری (Arasimowicz and Floryszak-Wieczorek, 2007) و فلزات سنگین را در گیاهان کاهش می‌دهد (Xiong *et al.*, 2010). اثرگذاری نیتریک اکسید مربوط به میل ترکیبی شدید آن به آهن و پروتئین‌های تنظیمی آهن است (Arasimowicz and Floryszak-Wieczorek, 2007). هم‌چنین، نیتریک اکسید به عنوان یک عامل آنتی‌اکسیدان قادر به جاروب کردن اکسیژن‌های فعال می‌باشد و سلول‌های گیاه را از آسیب اکسیداتیو حفظ می‌کند (Xiong *et al.*, 2010). اما نیتریک اکسید خودش یک نوع نیتروژن فعال است و مطالعات نشان داده است که روی سلول‌های مختلف می‌تواند نقش حفاظتی یا اثر سمی داشته باشد که بستگی به غلظت آن و موقعیت عمل آن دارد (Lamattina *et al.*, 2003).

در سال‌های اخیر، اطلاعات کافی در مورد تعدیل سمیت نیکل در گیاهان وجود ندارد و هدف از پژوهش حاضر بررسی سمیت نیکل در گیاهچه‌های کلزا و نقش حفاظت احتمالی سالیسیلیک اسید و یا نیتریک اکسید برون‌زا[1] در برابر سمیت نیکل می‌باشد.

مواد و روش‌ها

کشت گیاه و تیماردهی

این پژوهش در مجتمع آزمایشگاهی واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار با تیمارهای نیکل، سالیسیلیک اسید و نیتریک اکسید، هرکدام در دو سطح انجام شد. در ابتدا بذرهای سالم کلزا (*Brassica napus* L. cv. PF) با محلول هیپوکلریت سدیم ۲٪ به مدت ۵ دقیقه سترون شده و سپس چندین مرتبه با آب مقطر سترون شسته شدند. جوانه‌زنی بذرها در ظروف پتری محتوی کاغذ صافی مرطوب و سترون به مدت چهار روز صورت گرفت. دانه‌رست‌های با اندازه یکسان انتخاب و به گلدان‌های پلاستیکی محتوی پرلیت سترون منتقل شدند و با محلول نیم‌حجمی هوگلند به مدت یک هفته آبیاری

[1] Exogenous

شدند سپس آبیاری دانه‌رست ها با محلول هوگلند کامل صورت گرفت. تیمارهای نیکل به صورت $NiCl_2 . 6H_2O$ درغلظت‌های شاهد و ۰/۵ میلی‌مولار و سالیسیلیک اسید (SA) و سدیم نیترو پروساید (SNP) به عنوان دهنده‌ی نیتریک اکسید (NO) در غلظت‌های شاهد و ۰/۲ میلی‌مولار به صورت جداگانه و توام با محلول غذایی هوگلند کامل بر گیاهچه‌های ۲۱ روزه اعمال گردید (Kazemi *et al.*, 2010). pH محلول غذایی در ٦ تنظیم شده و تیماردهی دو بار در هفته صورت گرفت. گیاهچه‌ها در شرایط تنظیم شده با طول روز ١٦ ساعت و شدت نور ۱۹۰ میکرومول فوتون در متر مربع در ثانیه و تناوب دمایی ۲۲ درجه سلسیوس در روز و ٢٦ درجه سلسیوس در شب و رطوبت نسبی ٥ ± ٦٥ درصد به مدت ده روز رشد یافتند. پس از سپری شدن دوره تیمار، برداشت گیاهچه‌ها انجام شد. ریشه‌ها و اندام‌های هوایی از یکدیگر جدا شده و وزن‌تر ریشه‌ها و اندام‌های هوایی تیمارهای مختلف تعیین گردید. نمونه‌های مورد استفاده (ریشه یا اندام هوایی) برای سنجش عناصر معدنی و تعیین وزن خشک با آب مقطر بدون یون شسته شده و در درون آون در دمای ۷۰ درجه سلسیوس به مدت ٤٨ ساعت خشک شدند (Rodriguez *et al.*, 2005).

سنجش عناصر

عمل هضم و عصاره‌گیری نمونه‌های پودر شده با کمک مخلوط اسیدی HNO_3:HCl (با نسبت حجمی ٥:١) انجام شد و ٦ میلی لیتر از مخلوط اسیدی به ازای ۰/۱ گرم ماده خشک مصرف شد. نمونه‌های هضم شده در حمام آبی ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ ساعت حرارت داده شدند تا اسید از محلول حذف شود. پس از سرد شدن، محلول‌های حاصله با کمک ارلن و پمپ خلاء و کاغذ واتمن شماره ۲ صاف و در بالن ژوژه ۵۰ میلی‌لیتری با آب بدون یون به حجم رسانده شدند (Sagner *et al.*, 1998). غلظت نیکل، کلسیم، منیزیم، آهن، پتاسیم، نیتروژن و فسفر در نمونه‌های آماده شده سنجیده شد. غلظت نهایی عناصر مورد بررسی بر حسب میلی‌گرم در هر گرم ماده خشک گزارش شد.

اندازه‌گیری مقدار نیکل، کلسیم، منیزیم و آهن

سنجش مقدار نیکل (Ni)، کلسیم (Ca)، منیزیم (Mg) و آهن (Fe) با کمک استانداردهای مربوطه به وسیله اسپکتروسکوپی جذب اتمی (Atomic Absorption Varian, SpectrAA-200) انجام شد.

اندازه‌گیری پتاسیم

اندازه‌گیری مقدار پتاسیم نمونه‌های آماده شده با کمک منحنی استاندارد به وسیله فلیم فتومتر (Flame Photometer, model 410, Sherwood Company) انجام شد (Ryan *et al.*, 2001).

اندازه‌گیری مقدار نیتروژن (N) و فسفر (P) با کمک استانداردهای مربوطه به وسیله اسپکتروفتومتر (UV-120-01, Shimadzu) به شرح زیر انجام شد:

سنجش فسفر

برای سنجش فسفر، به ۱ میلی‌لیتر از عصاره هضم شده، ۱ میلی لیتر معرف بارتن و ۳ میلی لیتر آب مقطر بدون یون اضافه گردید و محلول حاصل بلافاصله با ورتکس به شدت هم زده شد. پس از ۱۰ دقیقه، جذب نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ٤٥٠ نانومتر خوانده شد. معرف بارتن با ارتوفسفات تولید کمپلکس زرد رنگی می‌نماید که در طول موج ٤٥٠ نانومتر مقدار جذب رنگ تولید شده متناسب با غلظت ارتوفسفات می‌باشد. برای تعیین غلظت فسفر از منحنی استاندارد فسفر استفاده گردید (Kitson and Mellon, 1944) و غلظت فسفر نمونه‌های گیاهی محاسبه و بر حسب میلی‌گرم در گرم ماده‌ی خشک بیان شد.

سنجش نیتروژن کل

برای این منظور، به ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره‌های حاوی عناصر، ۲ میلی‌لیتر سدیم سیترات – سود، ۰/۸ میلی‌لیتر فنل در الکل و ۱/٦ میلی‌لیتر هیپوکلریت سدیم افزوده شد و با آب بدون یون به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. یون آمونیوم در محیط قلیایی در حضور هیپوکلریت سدیم با فنل رنگ آبی می‌دهد که مربوط به تشکیل یک اندوفنل است. سیترات‌سدیم جهت جلوگیری از تشکیل رسوب به کار می‌رود. جذب نمونه‌ها بعد از ۱۰ دقیقه در طول موج ٦٢٥ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. برای تخمین غلظت نیتروژن کل از منحنی استاندارد نیتروژن استفاده گردید (Weatherburn, 1967) و غلظت نیتروژن نمونه‌های گیاهی محاسبه شد و بر حسب میلی‌گرم در گرم ماده خشک بیان شد.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-16 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. گروه‌بندی میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ انجام شد.

نتایج و بحث

در گیاهچه‌هایی که فقط تحت تیمار نیکل بودند، علایم سمیت نیکل از جمله کلروز و لکه‌های نکروزه در سطح برگ‌ها مشاهده شد. افزودن سالیسیلیک اسید و سدیم نیترو پروساید (دهنده نیتریک اکسید) به‌ویژه در حالت توام به محیط کشت گیاهچه‌های تحت تیمار نیکل، موجب کاهش بروز این علایم شد. خلاصه نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای نیکل، سالیسیلیک اسید، نیتریک اکسید و برهم کنش‌های مختلف آن‌ها بر وزن‌تر و خشک و محتوی عناصر غذایی ریشه و اندام‌هوایی گیاهچه کلزا در جدول‌های ۱ و ۳ آورده شده است. در تیمار نیکل، وزن‌تر و خشک ریشه و اندام‌هوایی به‌طور معنی‌داری نسبت به گیاهچه‌های شاهد کاهش یافت. کاربرد جداگانه و به‌ویژه هم‌زمان سالیسیلیک اسید و نیتریک اکسید به طور قابل توجهی کاهش رشد گیاهچه‌های تحت تیمار نیکل را تعدیل نمود (جدول ۲). در گیاهچه‌های تیمار شده، مقادیر بالای نیکل در ریشه‌ها و برگ‌ها تجمع یافت. نیکل با تجمع در دیواره سلول موجب کاهش انعطاف‌پذیری دیواره‌های سلول می‌گردد و تکثیر سلول را مختل می‌کند و در نتیجه موجب کاهش رشد می‌گردد. اثر بازدارنده نیکل روی رشد گیاه توسط چندین محقق گزارش شده است (Pandey and Sharma, 2002; Gajewska and Sklodowska, 2008; Kazemi *et al.*, 2010). بسیاری از علایم سمیت نیکل در گیاهان از جمله کلروز و نکروزه شدن برگ‌ها، کاهش یا توقف رشد ریشه و اندام هوایی ناشی از اختلال یا عدم تعادل در تغذیه معدنی گیاه می‌باشد (Seregin and Kozhevnikova, 2006). در توافق با پژوهش حاضر، کاربرد نیتریک اکسید موجب بهبود رشد گیاهچه‌های یونجه تحت تنش کادمیوم گردید (Xu *et al.*, 2010) و سالیسیلیک اسید رشد گیاهان خیار تحت سمیت منگنز را افزایش داد (Shi and Zhu, 2008).

با افزودن نیکل در محلول غذایی، تجمع نیکل در اندام‌های گیاهی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. البته تجمع نیکل در ریشه‌ها بیش از اندام‌های هوایی بود. در گیاهچه‌های تحت تنش نیکل، با کاربرد سالیسیلیک اسید و نیتریک اکسید به‌طور جداگانه و به‌ویژه توام مقدار نیکل نسبت به تیمارهای نیکل تنها در ریشه‌ها افزایش و در اندام‌های هوایی به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (جدول ۲). در حضور سالیسیلیک اسید و یا نیتریک اکسید، تجمع نیکل در ریشه‌ها تقریباً بر عکس اندام‌های هوایی افزایش یافت. مطالعه نشان داده که نیتریک اکسید برون‌زا با افزایش مقادیر پکتین و همی‌سلولز دیواره سلول ریشه و افزایش تجمع کادمیوم در دیواره سلولی ریشه و کاهش تجمع کادمیوم در برگ‌های برنج، سمیت کادمیوم را در گیاهچه‌های برنج تعدیل می‌نماید (Xiong *et al.*, 2009). در مطالعه‌ای دیگر، کاربرد سدیم نیترو پروساید به عنوان ترکیب دهنده‌ی نیتریک اکسید موجب کاهش جذب کادمیوم در گیاهچه‌های یونجه تحت تنش کادمیوم گردید (Xu *et al.*, 2010). کاهش تجمع Ni در اندام هوایی به‌واسطه کاهش جذب Ni توسط ریشه و یا کاهش انتقال Ni از ریشه به اندام هوایی امکان‌پذیر خواهد بود. با توجه به این که در تیمارهای دارای سالیسیلیک اسید و یا نیتریک اکسید کاهش تجمع نیکل در اندام‌های هوایی تقریباً متناسب با افزایش تجمع نیکل در ریشه‌ها بوده است، بنابراین به نظر می‌رسد که نیتریک اکسید و به‌ویژه سالیسیلیک اسید توانسته است از انتقال Ni از ریشه به اندام هوایی بکاهد، به‌طوری که اثر همیاری سالیسیلیک اسید و نیتریک اکسید در تیمارهای هم‌زمان میزان تجمع Ni را در اندام هوایی به شدت کاسته است. بر خلاف نتایج پژوهش حاضر، کاربرد سالیسیلیک اسید برون‌زا در گیاهان بابونه آلمانی تحت تنش نیکل، مقدار Ni را در ریشه‌ها کاهش و در اندام‌های هوایی افزایش داد (Kovacik *et al.*, 2009). با توجه به این که به نظر می‌رسد تحقیق حاضر اولین پژوهش در زمینه اثرهای هم‌زمان سالیسیلیک اسید و نیتریک اکسید بر سمیت نیکل باشد، بنابراین گزارش‌هایی مبنی بر تایید یا رد این نتایج حتی در معرض سایر عناصر سنگین نیز به دست نیامده است. اما با توجه به این که اغلب گیاهان بردبار به عناصر سنگین مقدار زیادی از یون‌های فلزی را در ریشه‌های خود انباشته می‌کنند و باقی ماندن عناصر سنگین در ریشه‌ها، به‌ویژه در گونه‌هایی از گیاهان زراعی که ریشه آن‌ها مورد استفاده انسان قرار نمی‌گیرد، یکی از اهداف مهم بسیاری از پژوهش‌های حال حاضر دنیا محسوب می‌شود (Seregin and Kozhevnikova, 2006)، بنابراین نتایج حاصل از این تحقیق حایز اهمیت خواهد بود.

تیمار نیکل به تنهایی موجب کاهش معنی‌دار محتوی آهن ریشه‌ها و اندام‌های هوایی گردید. در تیمارهای فاقد نیکل، کاربرد سالیسیلیک اسید و نیتریک اکسید به‌طور جداگانه و توام موجب افزایش معنی‌دار محتوی آهن ریشه و اندام هوایی نسبت به گیاهچه‌های شاهد شد. در تیمارهای دارای نیکل نیز کاربرد جداگانه و توام سالیسیلیک اسید و نیتریک اکسید موجب افزایش معنی‌دار محتوی آهن ریشه و اندام هوایی نسبت به تیمارهای نیکل تنها گردید، ضمن آن که افزایش محتوی آهن ریشه به‌ویژه در حضور نیتریک اکسید تنها قابل توجه بود. هم‌چنین، کاربرد نیتریک اکسید به‌طور جداگانه و همراه با سالیسیلیک اسید موجب افزایش چشمگیر محتوی آهن اندام هوایی در گیاهچه‌های تحت تنش نیکل شد، به‌طوری که محتوی آهن اندام هوایی در این گیاهچه‌ها تا سطح گیاهچه‌های شاهد افزایش یافت (شکل ۱). جذب کلسیم به وسیله ریشه تحت تاثیر حضور نیکل در محلول غذایی به شدت کاهش یافت. محتوی کلسیم اندام هوایی نیز همانند ریشه‌ها به‌طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت. در تیمارهای نیکل، حضور جداگانه نیتریک اکسید و به‌ویژه سالیسیلیک اسید موجب افزایش معنی‌دار محتوی کلسیم ریشه و اندام هوایی نسبت به تیمار نیکل تنها شد. هم‌چنین با کاربرد توام سالیسیلیک اسید و نیتریک اکسید، فقط محتوی کلسیم اندام هوایی به‌طور قابل توجهی افزایش یافت (شکل ۱). با افزودن نیکل در محلول غذایی، میزان منیزیم ریشه‌ها و اندام‌های هوایی کاهش یافت. اثر جبران کنندگی سالیسیلیک اسید و نیتریک اکسید به‌طور جداگانه و به‌ویژه اثر توام آن‌ها در تیمارهای نیکل، موجب افزایش محتوی منیزیم ریشه و اندام هوایی گردید، به نحوی که در برهم کنش متقابل سالیسیلیک اسید و نیتریک اکسید در گیاهچه‌های تحت تیمار نیکل، محتوی منیزیم اندام هوایی تا سطح گیاهچه‌های شاهد افزایش یافت (شکل ۲). با افزودن نیکل در محیط رشد، محتوی پتاسیم ریشه و اندام هوایی به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. در گیاهچه‌های تحت تنش نیکل، کاربرد نیتریک اکسید به تنهایی موجب کاهش معنی‌دار محتوی پتاسیم ریشه و کاربرد سالیسیلیک اسید جداگانه موجب افزایش معنی‌دار محتوی پتاسیم ریشه نسبت به تیمار نیکل تنها شد، ولی در حضور توام سالیسیلیک اسید و نیتریک اکسید تغییر معنی‌داری رخ نداد. در گیاهچه‌های تحت تیمار نیکل، در حضور سالیسیلیک اسید و نیتریک اکسید به‌ویژه در تیمار هم‌زمان این دو ماده، محتوی پتاسیم اندام هوایی به‌طور معنی‌داری نسبت به تیمار نیکل تنها افزایش یافت (شکل ۲). محتوی فسفر ریشه و اندام هوایی نیز با افزودن نیکل در محیط کشت به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. در گیاهچه‌های تحت تیمار نیکل، کاربرد نیتریک اکسید به‌طور جداگانه و همراه با سالیسیلیک اسید محتوی فسفر ریشه را در مقایسه با تیمار نیکل تنها به‌طور معنی‌داری کاهش داد، ولی در حضور سالیسیلیک اسید این کاهش معنی‌دار نبود. در گیاهچه‌های تحت تیمار نیکل، در حضور جداگانه و به‌ویژه توام سالیسیلیک اسید و نیتریک اکسید، محتوی فسفر اندام هوایی نسبت به تیمار نیکل تنها به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. در تیمارهای فاقد نیکل نیز در حضور نیتریک اکسید جداگانه و همراه با سالیسیلیک اسید، محتوی فسفر اندام هوایی نسبت به گیاهچه‌های شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (جدول ٤). تیمار نیکل موجب افزایش معنی‌دار محتوی نیتروژن ریشه شد. هم‌چنین در گیاهچه‌های تحت تیمار نیکل، کاربرد هم‌زمان سالیسیلیک اسید و نیتریک اکسید موجب افزایش معنی‌دار محتوی نیتروژن ریشه نسبت به تیمار نیکل تنها شد. کاربرد نیکل در محیط کشت منجر به کاهش معنی‌دار محتوی نیتروژن اندام هوایی شد. وقتی سالیسیلیک اسید یا نیتریک اکسید به همراه یون‌های نیکل به محیط کشت اضافه شد، محتوی نیتروژن اندام هوایی نسبت به تیمار نیکل تنها به‌طور معنی‌داری افزایش یافت و این افزایش به‌ویژه در تیمار هم‌زمان این سه ماده قابل توجه بود (جدول ٤).

نتایج تحقیق حاضر بیان‌گر کاهش محتوی کلسیم، منیزیم، آهن، پتاسیم و فسفر ریشه و اندام هوایی در تیمارهای دارای نیکل تنها بود. اما الگوی تغییرات محتوی نیتروژن با بقیه عناصر مورد بررسی متفاوت بود. یکی از مهم‌ترین اثر فلزات سنگین، دخالت در جذب عناصر مورد نیاز گیاه و در نتیجه ایجاد اختلال در تغذیه معدنی گیاه است (Zornoza *et al.*, 1999). نیکل به صورت رقابتی، جایگاه‌های انتقال ریشه‌ای کاتیون‌های دوظرفیتی همانند کلسیم، منیزیم و آهن را اشغال می‌کند و می‌تواند به‌طور مستقیم از جذب آن‌ها جلوگیری نماید. هم‌چنین یون‌های Ni^{2+} بر ترکیب فسفولیپید و استرول غشای پلاسمایی اثر گذاشته و فعالیت H^{+}-ATPase و نفوذپذیری غشا را در ریشه‌ها تغییر می‌دهند (Kozhevnikova, Seregin and 2006).

تاکنون تعدادی گزارش درباره اثر نیتریک اکسید بر بهبود تغذیه معدنی آهن در گیاهان تحت شرایط عادی و تحت تنش ارایه شده است (Graziano *et al.*, 2002; Murgia *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2007). هم‌چنین، افزایش جذب یون‌های کلسیم و پتاسیم توسط نیتریک اکسید برون‌زا در گیاهچه‌های یونجه تحت تنش کادمیوم گزارش شده است (Xu *et al.*, 2010). اما در مورد اثر نیتریک اکسید بر تغذیه معدنی سایر عناصر در گیاهان، گزارشی به دست نیامده است. در پژوهش حاضر، نیتریک اکسید موجب افزایش جذب و انتقال آهن در تیمارهای نیکل شد. کاربرد سدیم نیترو پروساید (دهنده نیتریک اکسید) موجب افزایش قابلیت دسترسی آهن در گیاهان می‌گردد (Graziano *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2007). سازوکار دقیق اثر نیتریک اکسید بر جذب یا انتقال عناصر معدنی در گیاهان مشخص نشده است و احتیاج به پژوهش‌های بیشتر در این زمینه دارد. اما ژانگ و همکاران (Zhang *et al.*, 2009) نشان دادند که کاربرد نیتریک اکسید برون‌زا، فعالیت H^+-ATPase غشای پلاسمایی سلول‌های ریشه را در گیاهان گوجه فرنگی تحت تنش مس به‌طور قابل توجهی افزایش می‌دهد. با توجه به این‌که H^+-ATPase در غشای پلاسمایی سلول‌های ریشه نقش مهمی در جذب چندین یون معدنی ایفا می‌کند (Palmgren and Harper, 1999)، بنابراین در این پژوهش نیز ممکن است یکی از سازوکارهای افزایش جذب عناصر معدنی توسط نیتریک اکسید، تحریک فعالیت H^+-ATPase در غشای سلول‌های ریشه باشد.

الگوی اثر سالیسیلیک اسید بر جذب و انتقال عناصر معدنی کلسیم، منیزیم، آهن، فسفر و نیتروژن در این پژوهش کم و بیش مشابه اثر نیتریک اکسید بود. با این تفاوت که به غیر از یون آهن که میزان اثر نیتریک اکسید بر جذب و انتقال آن در گیاهچه‌های تحت تیمار نیکل بیشتر از اثر سالیسیلیک اسید بود، در مورد چهار یون دیگر، شدت اثر سالیسیلیک اسید بر جذب و انتقال یون‌ها در گیاهچه‌های تحت تنش نیکل بیشتر از نیتریک اکسید بود. در مورد پتاسیم نیز اثر سالیسیلیک اسید در گیاهچه‌های تحت تیمار نیکل با نیتریک اکسید متفاوت بود. تاکنون فقط تعداد اندکی گزارش نشان داده‌اند که سالیسیلیک اسید بر جذب و انتقال عناصر غذایی گیاهان تحت سمیت فلز سنگین اثر می‌گذارد (Metwally *et al.*, 2003; Drazic and Mihailovic, 2005; Shi and Zhu, 2008). به‌علاوه نتایج این گزارش‌ها بسیار متفاوت هستند. بنابراین شناخت دقیق سازوکارهای مربوط به اثر سالیسیلیک اسید بر جذب و انتقال عناصر غذایی در گیاهان احتیاج به تحقیق بیشتر در این زمینه دارد. اما طبق گزارش گانز و همکاران (Gunes *et al.*, 2007)، کاربرد سالیسیلیک اسید برون‌زا در گیاه موجب فعال شدن H^+-ATPase های غشای پلاسمایی می‌شود. همان‌طوری که در مورد نیتریک اکسید نیز گفته شد، با فعال شدن H^+-ATPase ها، جذب یون‌های معدنی تسریع می‌شود و تغذیه معدنی گیاه بهبود می‌یابد (Palmgren and Harper, 1999). احتمالاً سالیسیلیک اسید به این‌طریق جذب یون‌های معدنی به‌ویژه Ca^{2+}، Mg^{2+} و Fe^{2+} را در گیاهچه‌های کلزا تحت تنش نیکل افزایش داده است. اما بر خلاف نتایج این پژوهش، افزودن سالیسیلیک اسید به محیط غذایی گیاهان خیار تحت سمیت منگنز از جذب آهن جلوگیری کرد (Shi and Zhu, 2008).

تاکنون هیچ گزارشی در زمینه‌ی اثر هم‌زمان سالیسیلیک اسید و نیتریک اکسید بر جذب و انتقال عناصر معدنی در گیاهان تحت شرایط عادی یا تنشی به‌دست نیامده است و شناخت دقیق سازوکارهای مربوطه به پژوهش‌های بیشتری نیازمند است. اما با توجه به این‌که افزایش رشد و تقسیم سلولی در حضور سالیسیلیک اسید و نیتریک اکسید به گسترش سیستم ریشه‌ای نیز منجر شده است، بنابراین رشد و گسترش سیستم ریشه‌ای به افزایش جذب مواد معدنی هم توسط گیاهچه کلزا کمک خواهد کرد. به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که در تیمارهای متقابل سالیسیلیک اسید و نیتریک اکسید، با تشدید اثر همیاری سالیسیلیک اسید و نیتریک اکسید بر رشد و تقسیم سلولی و هم‌چنین جذب و انتقال عناصر غذایی، تغذیه معدنی گیاهچه‌های کلزا در شرایط تنش نیکل به‌طور قابل ملاحظه‌ای بهبود یافته است.

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر تیمار نیکل در حضور تیمارهای سالیسیلیک اسید و نیتریک اکسید بر وزن‌تر و خشک ریشه و اندام هوایی و عناصر غذایی اندازه‌گیری شده در گیاهچه‌های کلزای بهاره رقم PF

Table 1. Analysis of variance for the effect of Ni treatment in the presence of salicylic acid and sodium nitroprusside treatments on fresh and dry weight of root and shoot and the measured nutrient elements in spring canola seedlings cv. PF

		Mean Squares									
S.O.V.	D.F.	Root fresh weight	Root dry weight	Shoot fresh weight	Shoot dry weight	Root Ni content	Shoot Ni content	Root Fe content	Shoot Fe content	Root Ca content	Shoot Ca content
Nickel (Ni)	1	0.297**	2007.56**	7.05**	76843.76**	2061.75**	46.99**	6.861**	0.354**	7901.4**	1635.11**
Salicylic acid (SA)	1	0.012*	46.03**	2.70*	13397.2**	2.335^{ns}	2.188**	0.078^{ns}	0.103**	78.97**	136.64**
Nitric oxide (NO)	1	0.042**	157.17**	1.77*	1361.63**	0.586^{ns}	0.473^{ns}	2.214**	0.228**	8.231^{ns}	27.72**
Ni×SA	1	0.004^{ns}	17.08**	0.964^{ns}	285.36*	23.41*	2.189**	0.056^{ns}	0.008^{ns}	0.633^{ns}	122.14**
Ni× NO	1	0.003^{ns}	1.014^{ns}	0.792^{ns}	2774**	5.089^{ns}	0.476^{ns}	0.010^{ns}	0.123**	3.678^{ns}	46.96**
SA× NO	1	0.039**	1.186^{ns}	0.248^{ns}	2.588^{ns}	0.120^{ns}	0.088^{ns}	2**	0.094**	164.06**	8.965^{ns}
Ni× SA× NO	1	0.160**	6.218*	0.392^{ns}	275.05*	41.12*	1.088*	0.122^{ns}	0.001^{ns}	42.821*	0.383^{ns}
Error	24	0.002	1.78	0.379	64.06	0.939	0.162	0.049	0.002	7.764	2.62

ns، * و **: به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪

ns, * and **: non significant and significant at the 5% and 1% of probability levels, respectively.

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر تیمار نیکل در حضور تیمارهای سالیسیلیک اسید و سدیم نیترو پروساید بر محتوی نیکل و وزن‌تر و خشک ریشه‌ها و اندام‌های هوایی گیاهچه کلزای بهاره رقم PF

Table 2. Mean comparison for the effect of Ni treatment in the presence of salicylic acid and sodium nitroprusside treatments on Ni content and fresh and dry weight of roots and shoots in spring canola seedling cv. PF

Ni (mM)	SA (mM)	SNP (mM)	Root fresh weight ($g.plant^{-1}$)	Root dry weight ($mg.plant^{-1}$)	Shoot fresh weight ($g.plant^{-1}$)	Shoot dry weight ($mg.plant^{-1}$)	Root Ni content ($mg.\ g^{-1}$ dry weight)	Shoot Ni content ($mg.\ g^{-1}$ dry weight)
0	0	0	0.378 ± 0.02^{b}	27.47 ± 0.78^{b}	3.29 ± 0.43^{a}	235.40 ± 3.85^{b}	0.007^{c}	0.002^{d}
0	0.2	0	0.392 ± 0.03^{b}	28.40 ± 0.73^{b}	3.60 ± 0.32^{a}	269.70 ± 5.22^{a}	0.007^{c}	0.002^{d}
0	0	0.2	0.448 ± 0.01^{a}	31.93 ± 0.91^{a}	3.23 ± 0.46^{a}	229.17 ± 3.07^{b}	0.007^{c}	0.002^{d}
0	0.2	0.2	0.468 ± 0.02^{a}	32.88 ± 0.86^{a}	3.40 ± 0.41^{a}	264.78 ± 4.03^{a}	0.006^{c}	0.002^{d}
0.5	0	0	0.158 ± 0.01^{e}	10.05 ± 0.44^{e}	1.58 ± 0.17^{d}	112.72 ± 3.11^{f}	15.12 ± 0.68^{b}	3.29 ± 0.31^{a}
0.5	0.2	0	0.229 ± 0.007^{d}	14.22 ± 0.36^{d}	2.50 ± 0.08^{bc}	159.12 ± 4.49^{d}	16.45 ± 0.67^{ab}	2.04 ± 0.37^{bc}
0.5	0	0.2	0.239 ± 0.006^{d}	14.75 ± 0.37^{d}	2.16 ± 0.08^{c}	143.90 ± 3.76^{e}	15.91 ± 0.50^{ab}	2.60 ± 0.23^{b}
0.5	0.2	0.2	0.291 ± 0.010^{c}	18.30 ± 0.59^{c}	2.82 ± 0.16^{ab}	191.28 ± 4.03^{c}	16.74 ± 0.83^{a}	1.76 ± 0.16^{c}

داده‌ها، میانگین ± خطای استاندارد هستند. حروف غیرمشابه در هر ستون اختلاف معنی‌دار بین تیمارها را در سطح احتمال ۵٪ نشان می‌دهد.

Data are means ± standard error. Different letters in each column indicate significant difference between treatments at 5% of probability level.
Ni: Nickel, SA: Salicylic acid, SNP: Sodium nitroprusside

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر تیمار نیکل در حضور تیمارهای سالیسیلیک اسید و نیتریک اکسید بر عناصر غذایی اندازه‌گیری شده در گیاهچه‌های کلزای بهاره رقم PF

Table 3. Analysis of variance for the effect of Ni treatment in the presence of salicylic acid and sodium nitroprusside treatments on the measured nutrient elements in spring canola seedlings cv. PF

		Mean Squares							
S.O.V.	D.F.	Root Mg content	Shoot Mg content	Root K content	Shoot K content	Root P content	Shoot P content	Root N content	Shoot N content
Ni	1	15.71**	1.77^{ns}	886.25**	3126.9**	121.18**	32.68**	445.11**	5.831^{ns}
SA	1	17.22**	20.91**	82.71**	685.46**	2.065**	4.365**	1.412^{ns}	40.67**
NO	1	1.07^{ns}	3.575*	27.47**	274.51**	1.977**	11.90**	4.826^{ns}	12.83**
Ni×SA	1	1.13^{ns}	20.13**	2.72^{ns}	1162.07**	0.099^{ns}	4.42**	2.863^{ns}	29.11**
Ni× NO	1	2.31*	19.02**	31.38**	258.78**	3.868**	0.616^{ns}	6.205^{ns}	14.48**
SA× NO	1	0.28^{ns}	0.561^{ns}	7.66^{ns}	2.63^{ns}	0.086^{ns}	0.101^{ns}	1.750^{ns}	1.01^{ns}
Ni× SA× NO	1	3.861*	0.326^{ns}	12.80*	4.65^{ns}	1.04*	0.585^{ns}	8.146*	4.413^{ns}
Error	24	0.556	0.683	2.27	4.51	0.235	0.179	1.697	1.402

ns، * و **: به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪

ns, * and **: non significant and significant at the 5% and 1% of probability levels, respectively.

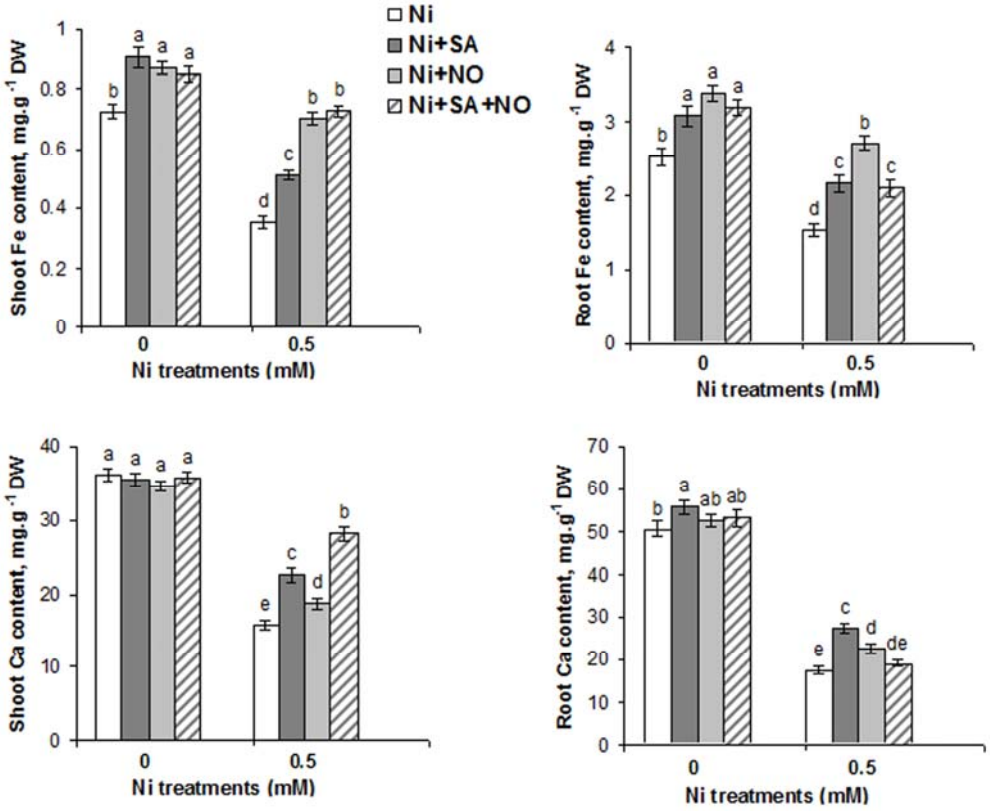
جدول ٤- مقایسه میانگین اثر تیمار نیکل در حضور تیمارهای سالیسیلیک اسید و سدیم نیترو پروساید بر محتوی فسفر و نیتروژن ریشه و اندام‌های هوایی گیاهچه کلزای بهاره رقم PF

Table 4. Mean comparison for the effect of Ni treatment in the presence of salicylic acid and sodium nitroprusside treatments on P and N content of roots and shoots in spring canola seedling cv. PF

Ni (mM)	SA (mM)	SNP (mM)	Root P content (mg. g^{-1} dry weight)	Shoot P content (mg. g^{-1} dry weight)	Root N content (mg. g^{-1} dry weight)	Shoot N content (mg. g^{-1} dry weight)
0	0	0	9.27 ± 0.26 ^{a}	7.18 ± 0.30 ^{b}	19.87 ± 0.39 ^{c}	17.75 ± 0.32 ^{b}
0	0.2	0	8.57 ± 0.31 ^{b}	7.02 ± 0.20 ^{b}	18.74 ± 0.28 ^{c}	16.99 ± 0.44 ^{bc}
0	0	0.2	9.38 ± 0.26 ^{a}	8.52 ± 0.24 ^{a}	18.82 ± 0.38 ^{c}	16.57 ± 0.59 ^{bc}
0	0.2	0.2	8.84 ± 0.32 ^{ab}	8.68 ± 0.23 ^{a}	19.59 ± 0.52 ^{c}	18.01 ± 0.72 ^{b}
0.5	0	0	5.98 ± 0.20 ^{c}	4.43 ± 0.15 ^{e}	25.37 ± 0.66 ^{b}	12.90 ± 0.40 ^{d}
0.5	0.2	0	5.46 ± 0.14 ^{c}	6.29 ± 0.17 ^{cd}	26.40 ± 0.67 ^{ab}	17.45 ± 0.76 ^{bc}
0.5	0	0.2	4.66 ± 0.14 ^{d}	5.75 ± 0.15 ^{d}	27.04 ± 0.92 ^{ab}	15.90 ± 0.40 ^{c}
0.5	0.2	0.2	4.39 ± 0.19 ^{d}	6.85 ± 0.15 ^{bc}	28.05 ± 0.98 ^{a}	19.67 ± 0.84 ^{a}

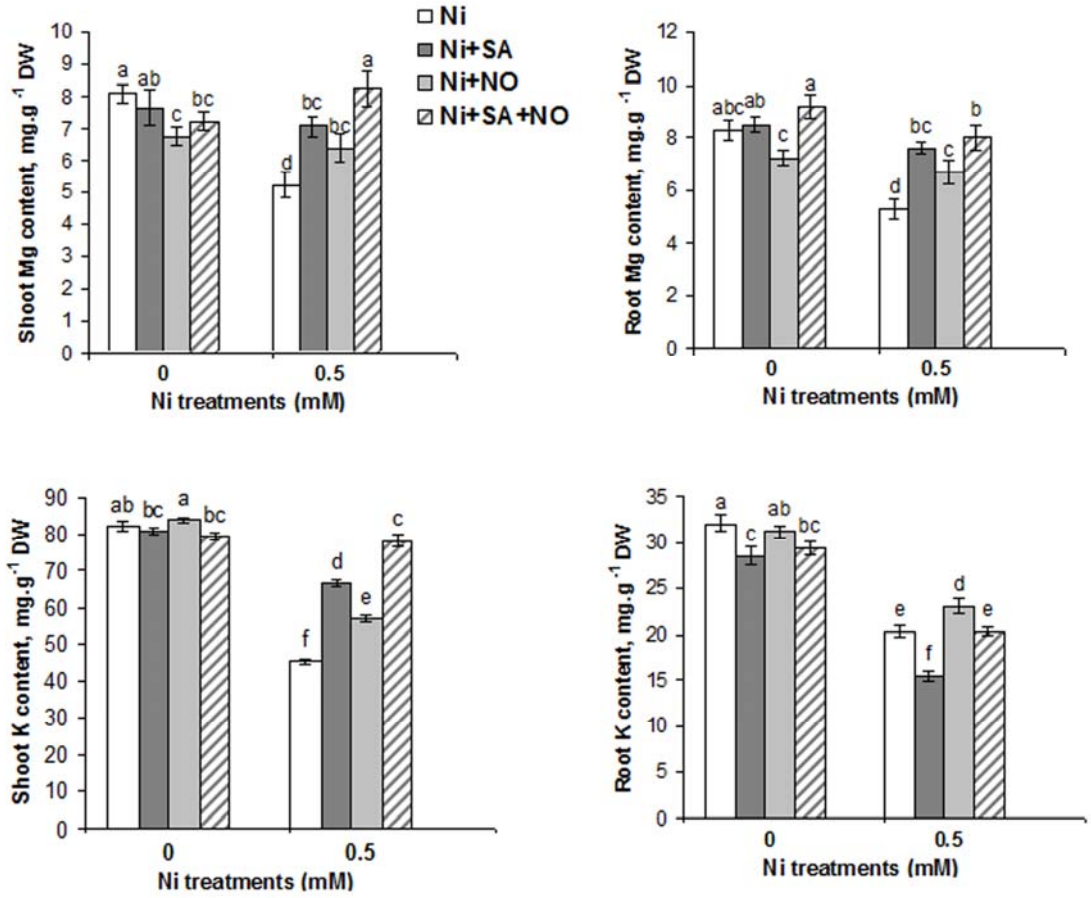
داده‌ها، میانگین ± خطای استاندارد هستند. حروف غیرمشابه در هر ستون اختلاف معنی‌دار بین تیمارها را در سطح احتمال ۵٪ نشان می‌دهد.

Data are means ± standard error. Different letters in each column indicate significant difference between treatments at 5% of probability level.



شکل ۱- اثر تنش نیکل در ترکیب با تیمارهای سالیسیلیک اسید و نیتریک اکسید بر میانگین محتوی آهن و کلسیم ریشه و اندام هوایی گیاهچه‌های کلزای بهاره رقم **PF**

Figure 1. Effect of Ni stress in combination with salicylic acid and nitric oxide treatments on mean content of Fe and Ca in root and shoot of spring canola seedlings cv. PF



شکل ۲- اثر تنش نیکل در ترکیب با تیمارهای سالیسیلیک اسید و نیتریک اکسید بر میانگین محتوی منیزیم و پتاسیم ریشه و اندام هوایی گیاهچه‌های کلزای بهاره رقم **PF**

Figure 2. Effect of Ni stress in combination with salicylic acid and nitric oxide treatments on mean content of Mg and K in root and shoot of spring canola seedlings cv. PF

References

Arasimowicz M, Floryszak-Wieczorek J (2007) Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses. Plant Science 172: 876-887.

Drazic G, Mihailovic N (2005) Modification of cadmium toxicity in soybean seedlings by salicylic acid. Plant Physiology 168: 511-517.

Gajewska E, Sklodowska M (2008) Differential biochemical responses of wheat shoots and roots to nickel stress: antioxidative reactions and proline accumulation. Plant Growth Regulation 54: 179-188.

Gimeno-Garcia E, Andreu V, Boluda R (1996) Heavy metals incidence in the application of inorganic fertilizers and pesticides to rice farming soil. Environmental Pollution 92: 19-25.

Graziano M, Beligni MV, Lamattina L (2002) Nitric oxide improves internal iron availability in plants. Plant Physiology 130: 1852-1859.

Gunes A, Inal A, Alpaslan M, Eraslan F, Bagci EG, Cicek N (2007) Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutrition in maize grown under salinity. Journal of Plant Physiology 164: 728-736.

Horvath E, Szalai G, Janda T (2007) Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling. Journal of Plant Growth Regulation 26: 290-300.

Kazemi N, Khavari-Nejad RA, Fahimi H, Saadatmand S, Nejad-Sattari T (2010) Effect of exogenous salicylic acid and nitric oxide on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in leaves of *Brassica napus* L. under nickel strees. Scientia Horticulturae 126: 402-407.

Kitson RE, Mellon MG (1944) Colorimetric determination of P as molybdovanadato phosphoric acid. Journal of Industrial and Engineering Chemistry 16: 379-383.

Kovacik J, Gruz J, Hedbavny J, Klejdus B, Strnad M (2009) Cadmium and nickel uptake are differentially modulated by salicylic acid in *Matricaria chamomilla* plants. Journal of Agricultural and Food Chemistry 57: 9848-9855.

Lamattina L, Garcia-Mata C, Graziano M, Pagnussat G (2003) Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. Annual Review of Plant Biology 54: 109-136.

Metwally A, Finkemeier I, Georgi M, Dietz KJ (2003) Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedlings. Plant Physiology 132: 272-281.

Murgia I, Delledonne M, Soave C (2002) Nitric oxide mediates iron-induced ferritin accumulation in *Arabidopsis*. Plant Journal 30: 521-528.

Palmgren MG, Harper JF (1999) Pumping with plant P-type ATPases. Journal of Experimental Botany 50: 883-893.

Pandey N, Sharma CP (2002) Effect of heavy metals Co^{2+}, Ni^{2+} and Cd^{2+} on growth and metabolism of cabbage. Plant Science 163: 753-758.

Raskin I (1992) Role of salicylic acid in plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 43: 439-463.

Rodriguez P, Torrecillas A, Morales MA, Ortuno MF, Sanchez-Bianco MJ (2005) Effects of NaCl salinity and water stress on growth and leaf water relations of *Asteriscus maritimus* plants. Environmental and Experimental Botany 53: 113-123.

Ryan J, Estefan G, Rashid A (2001) Soil and plant analysis laboratory manual. Interaction Center for Agricultural. Research in the Dry Areas. 172 pp.

Sagner S, Kneer P, Wanner G, Cosson JP, Numann BD, Zenk MH (1998) Hyperaccumulation, complexation and distribution of nickel in sebertia acuminate. Phytochemistry 47: 339-347.

Seregin IV, Kozhevnikova AD (2006) Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. Russian Journal of Plant Physiology 53: 257-277.

Shi Q, Zhu Z (2008) Effects of exogenous salicylic acid on manganese toxicity, element contents and antioxidative system in cucumber. Environmental and Experimental Botany 63: 317-326.

Stearns JC, Shah S, Greenbery BM, Dixon DG, Glick BR (2005) Tolerance of transgenic canola expressing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase to growth inhibition by nickel. Plant Physiology and Biochemistry 41: 701-708.

Sun B, Jing Y, Chen K, Song L, Chen F, Zhang L (2007) Protective effect of nitric oxide on iron deficiency-induced oxidative stress in maize (*Zea mays* L.). Journal of Plant Physiology 164: 536-543.

Weatherburn MV (1967) Phenol-hypochloride reaction for determination of ammonia. Analytical Chemistry 39: 971-974.

Xiong J, An L, Lu H, Zhu C (2009) Exogenous nitric oxide enhances cadmium tolerance of rice by increasing pectin and hemicellulose contents in root cell wall. Planta 230: 755-765.

Xiong J, Fu G, Tao L, Zhu C (2010) Roles of nitric oxide in alleviating heavy metal toxicity in plants. Archives of Biochemistry and Biophysics 497: 13-20.

Xu J, Wang W, Yin H, Liu X, Sun H, Mi Q (2010) Exogenous nitric oxide improves antioxidative capacity and reduces auxin degradation in roots of *Medicago truncatula* seedlings under cadmium stress. Plant and Soil 326: 321-330.

Zhang Y, Han X, Chen X, Jin H, Cui X (2009) Exogenous nitric oxide on antioxidative system and ATPase activities from tomato seedlings under copper stress. Scientia Horticulturae 123: 217-223.

Zhou ZS, Guo K, Elbaz AA, Yang ZM (2009) Salicylic acid alleviates mercury toxicity by preventing oxidative stress in roots of *Medicago sativa* L. Environmental and Experimental Botany 65: 27-34.

Zornoza P, Robles S, Martin N (1999) Alleviation of nickel toxicity by ammonium supply to sunflower plants. Plant and Soil 208: 221-226.