تأثیر هیومیک اسید بر شاخص‌های جوانه‌زنی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بذر کلزا (*Brassica napus* L.) تحت تأثیر سمیت نانو ذره اکسید مس

افسانه یارمحمدی، محمود خرمی وفا* و سعید جلالی هنرمند

گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه

(تاریخ دریافت: ۱۳۹٦/۱۲/۰۷، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۷/۰٤/۲۷)

چکیده

با توجه به افزایش تولید نانو ذرات در سال‌های اخیر و کاربرد آنها در برنامه‌های متنوع مانند پزشکی، تصویربرداری، کاتالیزور، نیمه‌رساناها، مواد آرایشی- بهداشتی، میکروالکترونیک، پوشش روی مواد مختلف و غیره، در حال حاضر نگرانی‌هایی درباره خطر آلودگی محیط‌زیست به نانو ذرات در سطح جهان به‌وجود آمده است. هدف از این پژوهش بررسی اثر سمیت نانو ذره اکسید مس بر فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، پروتئین و شاخص‌های جوانه‌زنی گیاه کلزا و همچنین بررسی اثرات هیومیک اسید بر کاهش سمیت نانو ذره در محیط آزمایشگاه بود. ازاین‌رو آزمایشی در مرحله جوانه‌زنی گیاه کلزا (رقم اکاپی) به‌منظور بررسی تأثیر نانو ذره اکسید مس در ۹ غلظت صفر، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰، ۱۰۰۰، ۱۲۵۰، ۱۵۰۰، ۱۷۵۰ و ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر و هیومیک اسید در دو غلظت صفر و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر، در سه تکرار به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت نانو ذره اکسید مس، میزان فعالیت هر چهار آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز و پراکسیداز به‌ترتیب ۵/۰۰، ۲/۱۹، ۲/۰۰ و ۲/۳۵ برابر افزایش ولی میزان پروتئین به میزان دو برابر کاهش یافت. همچنین شاخص‌های جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه، به‌ترتیب ۳۹/۰ و ٦/٥٦ برابر کاهش یافت. کاربرد هیومیک اسید باعث کاهش اثرات سمیت ناشی از نانو ذره اکسید مس به‌ویژه در سطح ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر گردید، به‌طوریکه میزان طول ریشه‌چه، ساقه‌چه، وزن‌تر ریشه‌چه و ساقه‌چه به‌ترتیب ۹،٦۸، ۳،/۰ ٦/۰ و ۵/۵۰ برابر نسبت به شاهد افزایش یافت. می‌توان اظهار داشت که هیومیک اسید با افزایش فعالیت شبه هورمونی می‌تواند سبب افزایش فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدان و رشد گیاه گردد.

کلمات کلیدی: آلودگی، درصد نهایی جوانه‌زنی، فعالیت بیوشیمیایی، گیاهان روغنی، مواد آلی طبیعی، نانو ذرات

مقدمه

فناوری نانو به‌طور گسترده‌ای در صنایع غذایی، علوم پزشکی، کشاورزی و غیره در سراسر جهان مورد استفاده قرار گرفته است (Safiuddin *et al.*, 2014). اگرچه نانو ذرات به‌طور طبیعی در محیط وجود دارند؛ ولی استفاده از فناوری نانو به افزایش قابل توجهی در تولید نانو ذرات مهندسی‌شده منجر شده است (Rajapaksha *et al.*, 2015). نانو ذرات به دو دسته کلی تقسیم‌بندی می‌شوند: مهندسی‌شده و غیر مهندسی. نانو ذرات غیر مهندسی به میزان زیادی در طبیعت وجود دارند و در بسیاری از فرایندهای طبیعی مانند واکنش‌های فتوشیمیایی،

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: Khoramivafa@gmail.com

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-07-15]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.18.6]

فوران‌های آتشفشانی، آتش‌سوزی جنگل‌ها و فرسایش تولید می‌شوند. نانو ذرات مهندسی‌شده عمدتاً توسط فعالیت‌های انسانی به وجود می‌آیند (Xu *et al.*, 2008).

نانو ذرات پس از انحلال به‌عنوان یون‌های فلزی عمل کرده که با گروه سولفیدریل و کربوکسیل پروتئین‌ها ارتباط برقرار می‌کنند و درنتیجه فعالیت آنها را تغییر می‌دهند. مس به‌عنوان یک فلز سمی قادر به انتقال الکترون به مولکول‌های اکسیژن برای تشکیل سوپر اکسیدهای واکنشی است این سمیت ناشی از نانو ذره به عدم تعادل تولید گونه‌های فعال اکسیژن منجر می‌شود (Thwala *et al.*, 2013). همچنین گیاهان مجهز به آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی هستند که سیستم‌های دفاعی برای محافظت از سلول‌ها در مقابل آسیب اکسیداتیو و گونه‌های فعال اکسیژن است (Hossain *et al.*, 2011).

هیومیک اسید شامل مخلوطی از ترکیبات آلی مختلف است که از باقی‌مانده اجزای گیاهان و حیوانات حاصل می‌شود، و ازآنجا که این ماده pH اسیدی ضعیف (۵ – ۳/۸) دارد به‌نام هیومیک اسید شناخته شده است. هیومیک اسید به‌دلیل اثرات هورمونی در بهبود جذب مواد غذایی و افزایش بیوماس ریشه، شاخساره مانند یک اسید آلی مشتق از هوموس عمل می‌کند (Nikbakht *et al.*, 2008; Mackowiak *et al.*, 2001)، ضمن اینکه نشان‌دهنده قسمت فعال و مهم مواد آلی طبیعی است که نقش مهمی در کاهش اثرات سمیت نانو ذرات دارد (Zhang *et al.*, 2008). مکانیسم عمل مواد آلی طبیعی بر تحریک رشد گیاهان مختلف به‌طور دقیق مشخص نیست، ولی در برخی منابع بر دو اثر مستقیم (افزایش فعالیت آنزیمی و نفوذپذیری غشا) و غیرمستقیم (جذب بهتر مواد غذایی) اشاره شده است (Jamali *et al.*, 2015). برخی محققان بر این باورند که مواد آلی طبیعی مانند هیومیک اسید و ورمی‌کمپوست برای پاک‌سازی فلزات از خاک گزینه مناسبی هستند. طی بررسی‌هایی نشان دادند که اصلاح‌کردن خاک‌های آلوده با مواد آلی طبیعی تحرک فلزات را کاهش می‌دهد (Pizzeghello *et al.*, 2013).

کلزا (*Brassica napus*) از خانواده Brassicaceae و سومین منبع روغن گیاهی پس از نخل و سویا و یک منبع مواد غذایی- دارویی مهم در جهان است. امروزه کلزا به خاطر بذرهایش کشت می‌شود چرا که بذرهای این گیاه بین ۳۵- ۴۵ درصد روغن دارد درنتیجه مصرف خوراکی آن بیشتر از سایر موارد مصرفی این گیاه است. البته مصارف صنعتی روغن کلزا زیاد است و احتمالاً اهمیت بیشتری نیز پیدا خواهد کرد (خواجه پور، ۱۳۹۰). گیاه کلزا در لیست گیاهان پیشنهادشده برای تحقیقات اثر سمیت نانو ذرات است که از طرف بخش محیط، بهداشت و ایمنی سازمان همکاری و توسعه اقتصادی (Organization for Economic Co-operation and Development–OECD) و سازمان حفاظت محیط زیست آمریکا (United States Environmental Protection Agency-USPA) نیز وجود دارد (Miralles *et al.*, 2012).

فناوری نانو در کنار فناوری زیستی و فناوری اطلاعات موج دیگری از انقلاب صنعتی را در جهان رقم زده است. ایران اکنون درزمینه تولید علوم نانو در رتبه هفتم جهان قرار دارد و جزء ۱۵ کشور برتر دنیا در حوزه فناوری نانو است. همچنین در ایران طی ۱۰ سال گذشته ۱۶۳ شرکت تولیدکننده محصولات و تجهیزات مبتنی بر فناوری نانو تأسیس شده‌اند. ایران طی سال‌های اخیر رشد چشمگیری در حوزه فناوری نانو داشته است که با افزایش میزان تولیدات فناوری نانو و استفاده بیش از حد از کودهای شیمیایی زمینه برای ورود این ذرات به محیط زیست فراهم خواهد شد. همچنین به دلیل برخورداری استان کرمانشاه از پتانسیل بالا برای تولیدات کشاورزی و گسترش توسعه صنایع، افزایش استفاده از مواد شیمیایی، کودها و غیره به افزایش آلودگی خاک و محیط زیست منجر می‌شود.

استفاده از هیومیک اسید در غلظت ۰/۱ گرم بر کیلوگرم در بستر آلوده به غلظت بیش از ۱۰۰۰ میلی‌گرم مس بر کیلوگرم اثرهای تقویت‌کنندگی روی رشد گیاه داشته و سبب افزایش وزن خشک اندام هوایی تربچه شد (Bandiera *et al.*, 2009). مطالعات نشان داد که افزودن هیومیک اسید باعث کاهش جذب مس شده است (Inaba and Takenaka, 2005; Remon *et al.*, 2005). برخی تحقیقات گزارش کردند که سطوح مختلف محلول پاشی هیومیک اسید باعث افزایش میزان

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-07-15]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.18.6]

آنتی‌اکسیدان‌ها ازجمله کاتالاز شده است (Endalew *et al.*, 2011). پژوهشگران در تحقیقی اثر هیومیک اسید را بر روی فلفل بررسی نمودند نتایج تحقیق آنها نشان داد که هیومیک اسید باعث افزایش وزن‌تر و خشک برگ و ساقه شده است (Gulser *et al.*, 2010). طی بررسی‌هایی گزارش کردند که اثر هیومیک اسید بر برنج باعث افزایش آنزیم آنتی‌اکسیدان می‌شود (Xie *et al.*, 2015).

نانو ذره اکسید مس باعث بازدارندگی جوانه‌زنی و طول ساقه در برنج، ذرت، خیار، سویا و نخود شد (Da Costa and Sharma, 2016; Nair and Chung, 2015; Moon *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015; Adhikari *et al.*, 2012. در معرض قرارگرفتن بذور کلزا با نانو ذرات اکسید روی منجر به از بین رفتن تقریباً کامل ریشه این گیاهان شد (Lin and Xing, 2007). کاهش در محتوای پروتئین محلول برگ تحت سمیت اکسید روی در گیاه یونجه گزارش شده است (Bandyopadhyay *et al.*, 2015).

هدف از اجرای این آزمایش، بررسی تأثیر هیومیک اسید بر فعالیت بیوشیمیایی و جوانه‌زنی گیاه کلزا در شرایط اعمال نانو ذره اکسید مس و بررسی اثر هیومیک اسید در کاهش اثر سمیت نانو ذره اکسید مس در مراحل اولیه جوانه‌زنی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و شاخص‌های جوانه‌زنی بود.

مواد و روش

به‌منظور بررسی اثرات نانو ذره اکسید مس (CuO) و نقش هیومیک اسید در کاهش سمیت آن روی گیاه کلزا، رقم اکاپی آزمایشی در آزمایشگاه فیزیولوژی گروه تولید و ژنتیک گیاهی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی کرمانشاه به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در سال ۱۳۹۵ انجام گرفت. فاکتورها عبارت از نانو ذره اکسید مس (CuO) در نه غلظت (صفر، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰، ۱۰۰۰، ۱۲۵۰، ۱۵۰۰، ۱۷۵۰ و ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و هیومیک اسید در دو غلظت (صفر و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بودند. نانو ذره مورد استفاده در این آزمایش از شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان مشهد تهیه شد. هیومیک اسید مصرفی نیز تولید شرکت (EURO SOLLDS) با نام تجاری HURO HUMIC گرانول محلول در آب دارای ٦٨٪ هیومیک اسید، ۱۰-۳۰٪ فولیک اسید، ۷/۵٪ پتاسیم اکسید، ۱۲٪-۲۲ نیتروژن آلی بود. جهت تهیه غلظت‌های مورد نظر، نانو ذره اکسید مس در آب‌مقطر به حالت سوسپانسیون درآمد و برای حصول محلولی یکنواخت و همگن، از دستگاه حمام اولتراسونیک (مدل Heating - ساخت شرکت James) به مدت ۳۰ دقیقه و دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد استفاده شد (Adhikari *et al.*, 2012).

آزمون جوانه زنی استاندارد براساس دستورالعمل انجمن بین‌المللی آزمون بذر اجرا شد (ISTA, 2005). برای این منظور ۲۵ عدد بذر کلزا پس از ضدعفونی با محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد و سه بار شستشو با آب‌مقطر استریل‌شده، در پتری‌دیش قرار داده شدند و ۵ میلی‌لیتر از نانو ذره اکسید مس و هیومیک اسید به پتری‌دیش اضافه و سپس پتری دیش‌های حاوی بذور به ژرمیناتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل گردید تا مراحل جوانه‌زنی در آن طی شود. بذرها به‌صورت روزانه (یکبار در طی روز) بازبینی شد و تعداد بذور جوانه‌زده دارای طول ریشه‌چه ۲ میلی‌متر ثبت گردید (ISTA, 2005). همچنین در روز هشتم از هر تکرار ۵ نمونه به‌طور تصادفی برداشته شد و چند شاخص ازجمله: طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه و وزن‌تر ریشه‌چه و ساقه‌چه اندازه‌گیری گردید. نمونه‌برداری‌ها برای انجام اندازه‌گیری‌های بیوشیمیایی در روز هشتم انجام گرفت(ISTA, 2005).

جهت عصاره‌گیری، ابتدا ۰/۵ گرم از نمونه برگ در هاون خرد و ۲ میلی‌لیتر بافر به آن افزوده و سپس کوبیده شد. مخلوط حاصل در لوله اپیندورف به‌مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ و پس از آن فاز بالایی جهت خواندن میزان پروتئین و فعالیت آنزیم‌ها جدا گردید.

برای اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز، ۵۰ میکرو لیتر از عصاره استخراج‌شده با یک میلی‌لیتر محلول اندازه‌گیری آسکوربیک پراکسیداز مخلوط گردید. سپس جذب آن در طول‌موج ۲۹۰nm پس از مدت یک دقیقه با دستگاه الایزا (Biotek Power Wave xs_2) خوانده شد (Nakano and

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-07-15]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.18.6]

(Asada, 1981).

برای اندازه‌گیری میزان فعالیت کمی آنزیم پراکسیداز ۳۳ میکرولیتر از عصاره آنزیمی رقیق‌شده با یک میلی‌لیتر از سوبسترای پراکسیداز مخلوط و به‌مدت بیست دقیقه با فواصل ۳۰ ثانیه در طول‌موج ٤٧٠nm خوانده گردید (Chance and Maehly, 1955).

جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز ۵۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی رقیق‌شده با ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار pH = ۷ مخلوط و واکنش با اضافه‌کردن ۵۰۰ میکرو لیتر محلول هیدروژن پراکسید ٦٠ میلی‌مولار آغاز گردید. پس از گذشت زمان معین با ۲ میلی‌لیتر معرف دی‌کرومات (۵٪)، اسید استیک (۳:۱) واکنش پایان یافت. لوله‌های آزمایش به‌سرعت داخل حمام آب جوش به‌مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد. قرائت با استفاده از دستگاه الایزا در طول‌موج جذبی ۵۷۰ نانومتر صورت گرفت (Sinha, 1972).

برای اندازه‌گیری میزان فعالیت کمی آنزیم سوپراکسید دیسموتاز ابتدا ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره استخراج شده به‌کمک محلول استخراج به حجم نهایی ۲۰۰ میکرولیتر رسانده و به ٤ میلی‌لیتر محلول اندازه‌گیری سوپراکسید دیسموتاز که شامل ۵۰ میلی‌مول بافر فسفات پتاسیم با pH = ۷، ۷۵ میکرومولار نیترو بلو تترازولیوم، ۱۳ میلی‌مولار L- متیونین، ۰/۱ میلی مولار EDTA و ۲ میکرومولار ریبوفلاوین بود، مخلوط گردید. سپس دو نمونه بدون‌عصاره حاوی ۲۰۰ میکرولیتر بافر استخراج به‌عنوان کنترل و بلانک مورد استفاده قرار گرفت. پس از اضافه‌کردن عصاره استخراج محلول اندازه‌گیری سوپراکسید دیسموتاز به کوت اضافه شد. جهت انجام واکنش این مخلوط به‌مدت ۱۵ دقیقه در اتاقک نور قرار داده شد. سپس میزان جذب نوری محلول حاصل در دستگاه الایزا در طول‌موج ٥٦٠nm خوانده شد (Beauchamp and Fridovich, 1971).

برای اندازه‌گیری محتوای پروتئین ۲۰ میکرولیتر عصاره استخراج‌شده را در ۸۰ میکرولیتر بافر استخراج رقیق و ۵ میلی‌لیتر معرف کوماکسی‌بلو به آن افزوده و سپس ورتکس شد و پس از گذشت ۵ دقیقه، میزان جذب نوری آن در طول‌موج ۵۹۵ نانومتر خوانده در نهایت محتوای پروتئین در نمونه با توجه به جذب نمونه و با استفاده از منحنی استاندارد به‌دست آمد (Bradford, 1976).

تحلیل داده‌های حاصل از آزمایش با نرم افزار SAS و رسم نمودارها با Excel انجام شد. جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال پنج درصد استفاده شد.

نتایج و بحث

طول ریشه‌چه: نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که اثر هیومیک اسید، نانو ذره اکسید مس و اثر متقابل آنها بر طول ریشه‌چه در سطح احتمال ۰/۰۵ معنی‌دار بود (جدول ۱). نتایج نشان داد که کمترین میزان طول ریشه‌چه در سطح صفر هیومیک اسید و سطح ۲۰۰۰ نانو ذره اکسید مس (۲ میلی‌متر) بود. همچنین بیشترین طول ریشه‌چه در سطح ۱۰۰ هیومیک اسیدو صفر نانو ذره اکسید مس (۸۰ میلی‌متر) بود که با افزایش هیومیک اسید در مقابل نانو ذره اکسید مس میزان طول ریشه‌چه افزایش یافت و باعث کاهش اثر سمیت نانو ذره اکسید مس شد (جدول ۲). استفاده از هیومیک اسید در غلظت ۰/۱ گرم بر کیلوگرم در بستر آلوده به غلظت بیش از ۱۰۰۰ میلی‌گرم مس بر کیلوگرم اثرهای تقویت‌کنندگی روی رشد گیاه داشته است (Bandiera *et al.*, 2009).

سازوکار عمل هیومیک اسید به‌گونه‌ای است که از یک طرف با تولید بیشتر اسیدهای نوکلئیک و اسیدهای آمینه، تکثیر سلولی را در گیاه و به‌ویژه در ریشه‌ها افزایش می‌دهد و با افزایش نفوذپذیری سلول‌های ریشه به جذب بهتر مواد غذایی و توسعه بیشتر گیاه کمک می‌کند همچنین با پیوند به مولکول‌های آب تا حدود زیادی مانع تبخیر آب در گیاهان یک‌ساله، دوساله و چندساله می‌گردد (Brown *et al.*, 2014).

طول ساقه‌چه: نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که اثر هیومیک اسید، نانو ذره اکسید مس و اثر متقابل آنها بر طول ساقه‌چه در سطح احتمال ۰/۰۵ معنی‌دار بود (جدول ۱). نتایج

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-07-15]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.18.6]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.18.6] [Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-07-15]

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس برخی شاخص‌های جوانه‌زنی

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		طول ریشه‌چه	طول ساقه‌چه	وزن‌تر ریشه‌چه	وزن‌تر ساقه‌چه
هیومیک اسید	۱	۹۹٤/۱٦ *	٥۰۳۷/۱۰ *	۸۱٦/٦ *	٦۲٤۲٤ *
اکسید مس	۸	۳۱۷۰/٥۲ *	۱۱۳۰/۸۳ *	٥۱۷/۳ *	۱۰۰۳٥/۹ *
هیومیک اسید × اکسید مس	۸	۱۱/۹۱ *	۱۱۲/۱٤ *	۲۸/٦ *	۹۰۷/٥ *
خطا	–	۰/۸۸۲	۳/۰٦	۱/٦۲	٤٤/٤۲
ضریب تغییرات	–	٦/۱٦	٦/۹۰	۱۱/۱۱	۹/۲۱

*** و ns به‌ترتیب معنی‌داری و عدم‌معنی‌داری در سطح احتمال ۰/۰۵ را نشان می‌دهد.**

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل هیومیک اسید و اکسید مس بر برخی شاخص‌های جوانه‌زنی

هیومیک اسید (میلی‌گرم در لیتر)	اکسید مس (میلی‌گرم در لیتر)	طول ریشه‌چه (میلی‌متر)	طول ساقه‌چه (میلی‌متر)	وزن‌تر ریشه‌چه (میلی‌گرم)	وزن‌تر ساقه‌چه (میلی‌گرم)
۰	۰	۷۲/٦٦ b	٥۸/٦ a	۲۸ b	۱٦٥ a
۰	۲٥۰	٤ f	۱۳ e	۷ fg	٤٥/٦ g
۰	٥۰۰	۳/٦٦ gf	۱۳ e	٥/٦ gh	۳۰/۳ h
۰	۷٥۰	۳/٦۰ gf	۱۰ f	٥/۳ gh	۲٤ hi
۰	۱۰۰۰	۳/٥۰ gf	۹/٦۰ f	٥ gh	۱۹ hi
۰	۱۲٥۰	۳/٤٦ gf	۹/۲۰ f	٤/٦ h	۱٦ i
۰	۱٥۰۰	۳/۳۳ gfh	۹/۱ f	٤/٦ h	۱٥ i
۰	۱۷٥۰	۲/۳۳ gh	۹ f	٤ h	۱٤/۳ i
۰	۲۰۰۰	۲ h	۸/۹۳ f	٤ h	۱٤ i
۱۰۰	۰	۸۰ a	٦۱/۳ a	٤۲/۳ a	۱۷۸/۳ b
۱۰۰	۲٥۰	۱٦/۳۳ c	٤۲ b	۲۲/۳ c	۱٥۲/٦ c
۱۰۰	٥۰۰	۱٦ c	٤۰ b	۱۳/٦ d	۱۰۷/۳ d
۱۰۰	۷٥۰	۱٥ c	٤۰ b	۱۳/۳ d	۱۰٦/۳ d
۱۰۰	۱۰۰۰	۱۳ d	۲۸ c	۱۲/۳ d	۹۰ e
۱۰۰	۱۲٥۰	۹/٤۰ e	۲۷ dc	۱۰ e	۸۲/۳ e
۱۰۰	۱٥۰۰	۹/۳۳ e	۲٦ dc	۹ fe	۸۱/٦ ef
۱۰۰	۱۷٥۰	۸/٤٦ e	۲٥ d	۸/۳ fe	۸۱/۳ ef
۱۰۰	۲۰۰۰	۸/۲٦ e	۲٤ d	۷ fg	۷٦/٦ f
LSD	–	۱/٥٥	۲/۸۹	۲/۱۱	۱۱/۰۳

حرف یا حروف مشابه در هر ستون نشانگر عدم‌اختلاف معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد.

نشان داد که کمترین میزان طول ساقه‌چه در سطح صفر هیومیک اسید و سطح ۲۰۰۰ نانو ذره اکسید مس (۸/۹۳ میلی‌متر) اتفاق افتاد. همچنین بیشترین طول ساقه‌چه در سطح ۱۰۰ هیومیک اسید و سطح صفر نانو ذره اکسید مس (٦۱/۳

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-07-15]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.18.6]

میلی‌متر) بود که با افزایش میزان هیومیک اسید در مقابل نانو ذره اکسید مس میزان طول ساقه‌چه افزایش یافت و از سمیت نانو ذره اکسید مس کاسته شد (جدول ۲). اثر هیومیک اسید را بر ذرت و گندم مورد بررسی قرار دادند و دریافتند که هیومیک اسید می‌تواند موجب رشد ساقه و ریشه گیاه گردد (Eyheraguibel *et al*., 2008; Malik and Azam, 1985).

هیومیک اسید با تأثیر مثبت بر غشای سلولی و رشد طولی سلول‌ها باعث تحریک رشد ساقه گیاهان می‌شود (Yadollahi *et al.*, 2016). همچنین هیومیک اسید با بهبود جذب نیتروژن گیاهان (مانند تولید ترکیبات آلی نیتروژن دار چون پروتئین‌ها و اسیدهای آمینه)، سبب افزایش آنزیم‌ها و پروتئین‌های شرکت کننده در چرخه فتوسنتزی نظیر سیتوکروم‌ها، فردوکسین‌ها، پلاستوسیانین‌ها و آنزیم روبیسکو می‌شود و از این راه رشد را افزایش می‌دهد (Brown *et al.*, 2014).

وزن‌تر ریشه‌چه: نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که اثر هیومیک اسید، نانو ذره اکسید مس و اثر متقابل آنها بر وزن‌تر ریشه‌چه در سطح احتمال ۰/۰۵ معنی‌دار بود (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین نشان داد که کمترین میزان وزن‌تر ریشه‌چه در سطح صفر هیومیک اسید و سطح ۲۰۰۰ نانو ذره اکسید مس (٤ میلی‌گرم) بود همچنین بیشترین میزان وزن‌تر ریشه‌چه در سطح ۱۰۰ هیومیک اسید و سطح صفر نانو ذره اکسید مس (٤۲/۳ میلی‌گرم) مربوط بود (جدول ۲). طی بررسی دریافتند هیومیک اسید وزن‌تر ریشه‌چه ذرت را افزایش می‌دهد (Cordeiro *et al.*, 2011). هیومیک اسید با افزایش میزان جذب آب و حفظ رطوبت، وزن‌تر ریشه را افزایش می‌دهد و باعث کاهش اثر سمیت فلزات می‌شود (Pizzeghello *et al.*, 2013).

وزن‌تر ساقه‌چه: نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که اثر هیومیک اسید، نانو ذره اکسید مس و اثر متقابل آنها بر وزن‌تر ساقه‌چه در سطح احتمال ۰/۰۵ معنی‌دار بود (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین نشان داد که کمترین میزان وزن‌تر ساقه‌چه در سطح صفر هیومیک اسید و سطح ۲۰۰۰ نانو ذره اکسید مس (١٤ میلی‌گرم) بود همچنین بیشترین میزان وزن‌تر ریشه‌چه مربوط به سطح ۱۰۰ هیومیک اسید و سطح صفر نانو ذره اکسید مس (۱۷۸/۳ میلی‌گرم) بود (جدول ۲).

بررسی‌ها نشان داد هیومیک اسید وزن‌تر ساقه گیاه کلزا را افزایش می‌دهد (نظری و همکاران، ۱۳۹٦). در این رابطه اظهار شده است که هیومیک اسید از طریق اثرات هورمونی و با تأثیر بر متابولیسم‌های سلولی گیاهان سبب افزایش رشد گیاه و درنتیجه افزایش وزن‌تر ساقه‌چه و ریشه‌چه می‌شود (Salimon *et al.*, 2012).

فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز: جدول تجزیه واریانس نشان داد که اثر غلظت هیومیک اسید، نانو ذره اکسید مس بر آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در سطح احتمال ۰/۰۵ معنی‌دار بودند (جدول ۳). بر اساس نتایج به دست آمده، با افزایش غلظت نانو ذره اکسید مس، میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نیز افزایش پیدا کرده به‌طوری که حداکثر فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در غلظت ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر اکسید مس مشاهده گردید بر همین اساس بیشترین و کمترین میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در غلظت ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر و شاهد به ترتیب معادل (۲۱/۲۰ و ٤/۵۳ میکرو بر میلی‌گرم پروتئین) مشاهده شد؛ به‌عبارت دیگر میزان آنزیم سوپراکسید دیسموتاز تقریباً ۵ برابر نسبت به شاهد افزایش نشان داده است (شکل ۲). نتایج مقایسه میانگین اثر هیومیک اسید بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نشان داد که بیشترین میزان آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در سطح ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر (١٤/۳۷ میلی‌گرم در لیتر) بود که نسبت به سطح صفر هیومیک اسید ۱/۱۲ برابر افزایش نشان داد (شکل ۱). در آزمایشی مشابه، نانو ذره اکسید مس باعث افزایش میزان آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز در گیاه خیار شده است (Kim *et al.*, 2012).

تحقیقات انجام شده نشان داده است که آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نخستین آنزیمی است که در چرخه آنتی‌اکسیدان فعال می‌شود و در مدت تنش فعالیت آن افزایش می‌یابد (Chakraborty and Pradhan, 2011). این آنتی‌اکسیدان آنزیمی یک آنزیم فلزی (متالو آنزیم) است که یون سوپراکسید را

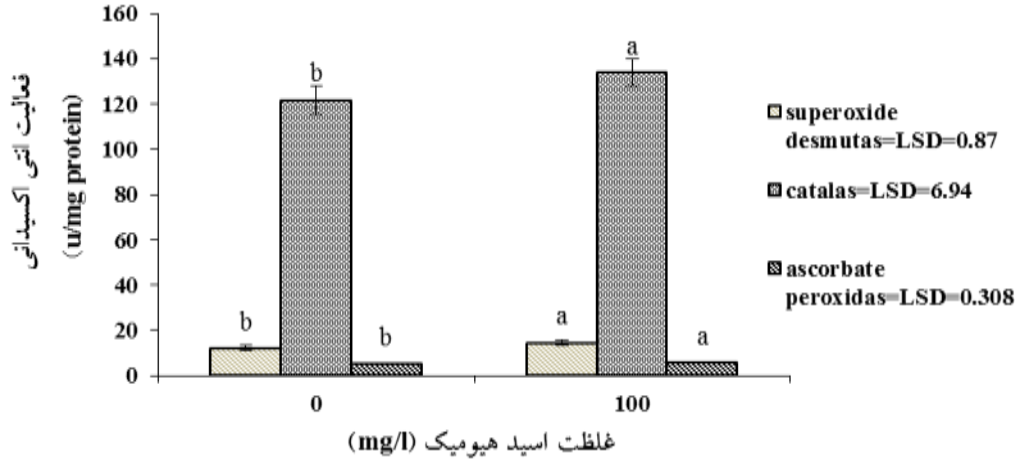
[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-07-15]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.18.6]

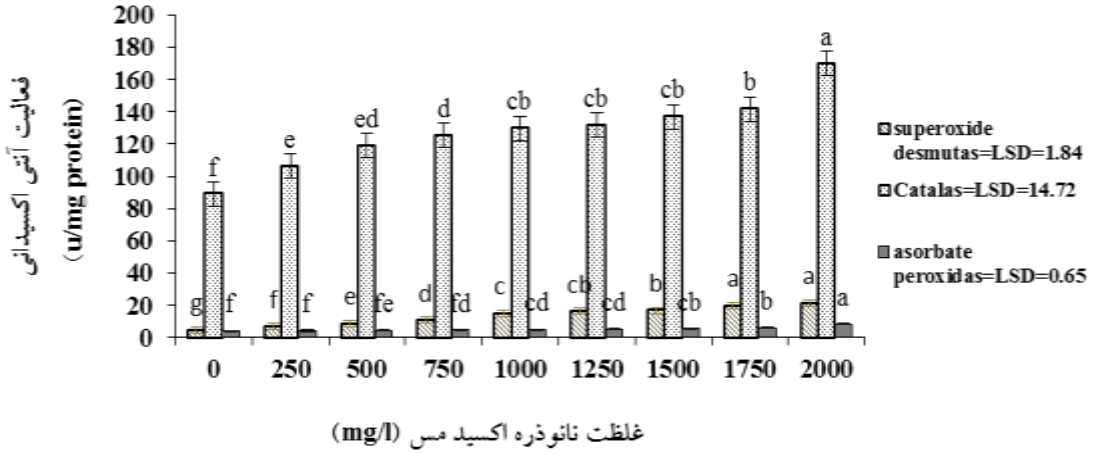
جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		کاتالاز	آسکوربات پراکسیداز	پراکسیداز	سوپراکسید دیسموتاز	پروتئین
هیومیک اسید	۱	۱۹۷۷/۳٤ *	۳/۲٥٦ *	۹٦۱٤/۱۷ *	۷۱/۰٦۹ *	۰/۸۷۳ *
اکسید مس	۸	۳۰۸٥/۳۲ *	۱۲/٥۹ *	۹۰٤۷/٦٦ *	۲۰۸/٦۱۹ *	۳/۰۱٥ *
هیومیک اسید × اکسید مس	۸	۹۷/۷۸ ns	۰/۱۰ ns	۱۱۸٥/۷۲ *	٤/٦۷ ns	۰/۰۷۱ ns
خطا	-	۱٥۸/۲	۰/۳۱	۸٤/٦۱	۲/٤۹	۰/۱٥۷
ضریب تغییرات	-	۹/۸٤	۱۰/۷۱	۷/۷۹	۱۱/۹۲	۱۰/۳۸

*** و ns به‌ترتیب معنی‌داری و عدم‌معنی‌داری در سطح احتمال ۰/۰۵ را نشان می‌دهد.**



شکل ۱- مقایسه میانگین اثر هیومیک اسید بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (میکرو بر میلی‌گرم پروتئین). حروف یکسان بیانگر عدم‌اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از آزمون LSD است.



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف نانو ذره اکسید مس بر فعالیت آنزیم‌های اکسیدانی (میکرو بر میلی‌گرم پروتئین)

تجزیه می‌کند. سوپراکسید به‌عنوان یکی از گونه‌های اصلی اکسیژن واکنش‌گر در سلول شناخته شده است که سبب تغییر ماهیت آنزیم‌ها، اکسیداسیون لیپیدها و آسیب به DNA می‌شود. سوپراکسید دیسموتاز اولین آنزیم در فرآیند سمیت زدایی

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-07-15]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.18.6]

گونه‌های فعال اکسیژن است که با تبدیل رادیکال سوپراکسید به پراکسید هیدروژن نقش حیاتی در مکانیسم‌های دفاعی سلول در برابر خطر تشکیل رادیکال‌های هیدروکسیل ایفا می‌کند و افزایش فعالیت این آنزیم نتیجه‌ای از تأثیر مستقیم یون‌های فلزات است (Mittler, 2002).

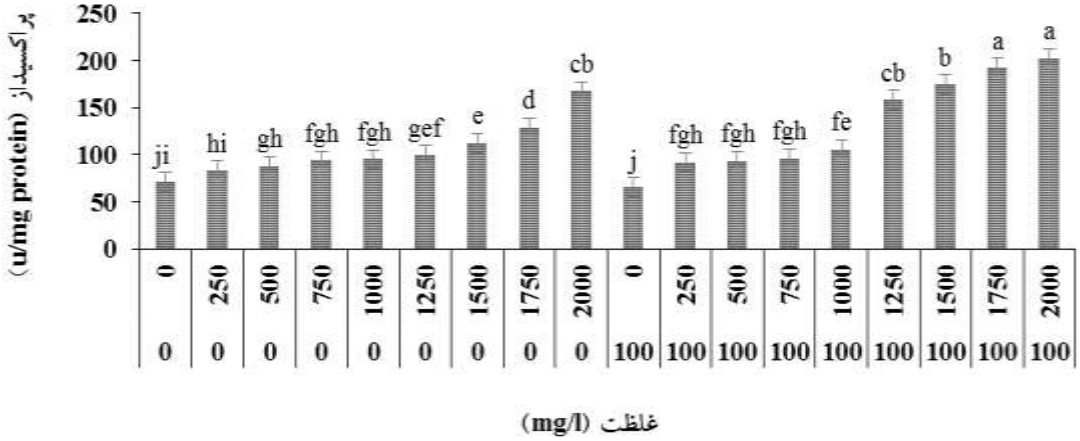
کاتالاز: نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که اثر غلظت هیومیک اسید و نانو ذره اکسید مس بر آنزیم کاتالاز در سطح احتمال ۰/۰۵ معنی‌دار بودند (جدول ۳). نتایج نشان داد با افزایش غلظت نانو ذره اکسید مس میزان فعالیت آنزیم کاتالاز تحت تأثیر قرار گرفت و میزان فعالیت این آنزیم افزایش پیدا کرد. همچنین نشان داده شد که بین شاهد و سایر سطوح اختلاف معنی‌داری وجود دارد به‌طوریکه بیشترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمار ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر با (۱۷۰ میکرو بر میلی‌گرم پروتئین) و کمترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در شاهد (۸۹/۰۳ میکرو بر میلی‌گرم پروتئین) که تقریباً دو برابر میزان آنزیم کاتالاز را نسبت به شاهد افزایش داد (شکل ۲). نتایج مقایسه میانگین اثر هیومیک اسید بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز نشان داد که میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در سطح ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر به‌طور معنی‌داری بیشتر از سطح صفر بود و به‌میزان ۱/۰۹ برابر افزایش نشان داد (شکل ۱). هیومیک اسید به‌دلیل ویژگی هورمونی ازجمله شبه سیتوکینین و از طریق تأثیر بر سیستم تنفس یاخته‌ای در تنظیم فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و سایر فعالیت‌های آنزیمی نیز دخالت می‌کند و موجب بهبود فعالیت‌های فیزیولوژیک گیاه و افزایش تحمل به تنش می‌شود (Zhang and Ervin, 2004). مشابه با نتایج به‌دست آمده از این آزمایش، گزارش شده است فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاه خیار و گندم سیاه به‌ترتیب تحت تأثیر نانو ذره‌های دی‌اکسید تیتانیوم و اکسید روی افزایش یافت (Thwala *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2013).

نانو ذرات پس از انحلال به‌عنوان یون‌های فلزی عمل کرده که با گروه سولفیدریل و کربوکسیل پروتئین‌ها ارتباط برقرار می‌کنند و درنتیجه فعالیت آنها را تغییر می‌دهند. مس به‌عنوان یک فلز سمی قادر به انتقال الکترون به مولکول‌های اکسیژن برای تشکیل سوپراکسیدهای واکنشی است؛ این سمیت ناشی از نانو ذره منجر به عدم‌تعادل تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود (Thwala *et al.*, 2013). گزارش شده است نانو ذرات باعث افزایش میزان تنش اکسیداتیو در خیار و برنج شده‌اند (Thwala *et al.*, 2013). در این رابطه اظهار شده است که گیاهان به آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی به‌عنوان سیستم‌های دفاعی برای محافظت از سلول‌ها در مقابل آسیب اکسیداتیو و گونه‌های فعال اکسیژن مجهز هستند (Hossain *et al.*, 2011). کاتالاز با اثر مستقیم بر هیدروژن پراکسید، سبب کاهش اثرهای سمی آن می‌شود. هیدروژن پراکسید ماده‌ای سمی است که طی بسیاری از مکانیسم‌ها و واکنش‌های طبیعی سلول ایجاد می‌شود. تجمع این ماده برای سلول‌ها و بافت‌ها بسیار آسیب‌رسان است و باید بلافاصله تجزیه شود. در واقع کاتالاز از هیدروژن پراکسید به‌عنوان سوبسترا استفاده می‌کند و با تجزیه سریع این ماده اثرهای مخرب آن را مهار می‌کند (Mittler, 2002).

آسکوربات پراکسیداز: نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که اثر غلظت هیومیک اسید و نانو ذره اکسید مس بر آنزیم آسکوربات پراکسیداز در سطح احتمال ۰/۰۵ معنی‌دار بود (جدول ۳). نتایج نشان داد با افزایش غلظت نانو ذره اکسید مس میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز افزایش پیدا کرد همچنین نشان داده شد که بین شاهد و سایر سطوح اختلاف معنی‌داری وجود دارد به‌طوریکه بیشترین میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در تیمار ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر با (۸/٦٤ میکرو بر میلی‌گرم پروتئین) و کمترین میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در شاهد (۳/۹۳ میکرو بر میلی‌گرم پروتئین) که ۲/۱۹ برابر افزایش را نسبت به شاهد نشان داد (شکل ۲). نتایج مقایسه میانگین اثر هیومیک اسید بر میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز نشان داد که بین غلظت‌های صفر و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر هیومیک اسید اختلاف معنی‌داری وجود داشت به‌طوریکه بیشترین میزان آنزیم آسکوربات پراکسیداز در سطح ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر (۵/٤٥ میلی‌گرم در لیتر) بود که نسبت به سطح صفر هیومیک اسید

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-07-15]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.18.6]



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل اسید هیومیک و اکسید مس بر میزان فعالیت پراکسیداز (میکرو بر میلی‌گرم پروتئین). حروف یکسان بیانگر عدم‌اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از آزمون LSD است.

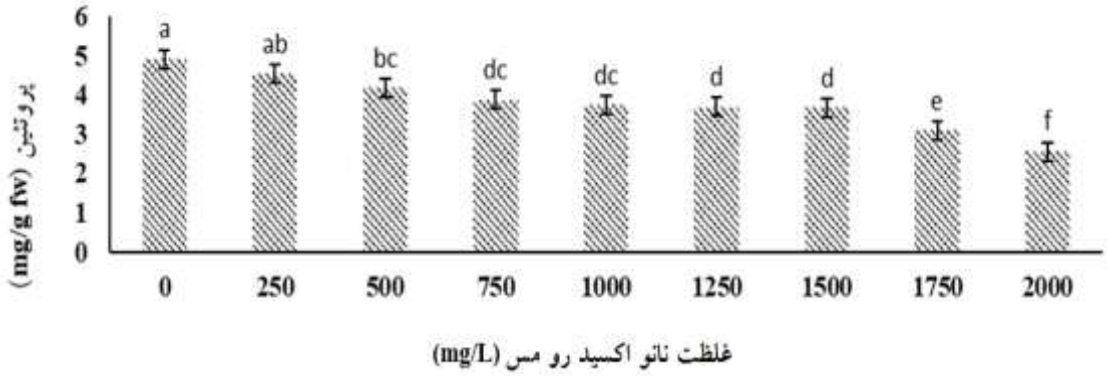
یک برابر افزایش نشان داد (شکل ۱). برخی از گزارش‌ها نیز فعالیت‌های شبه هورمونی ازجمله تأثیری همانند اکسین، جیبرلین و سیتوکینین از طریق حفظ نفوذپذیری غشا و افزایش متابولیسم سلولی که رشد گیاهان را در شرایط متفاوت محیطی افزایش می دهد، برای هیومیک اسید تأیید کرده‌اند (Cooper *et al.*, 1998).

مشابه با یافته‌های این آزمایش، آنزیم آسکوربات پراکسیداز تحت تأثیر کادمیوم افزایش یافت (Babula *et al.*, 2015; Mittler, 2002). آسکوربات پراکسیداز با کمک آسکوربیک اسید باعث حذف گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود لذا بالاتربودن فعالیت این آنزیم به‌معنی حذف بیشتر رادیکال‌های اکسیژن و کاهش مرگ سلولی است (Mittler, 2002).

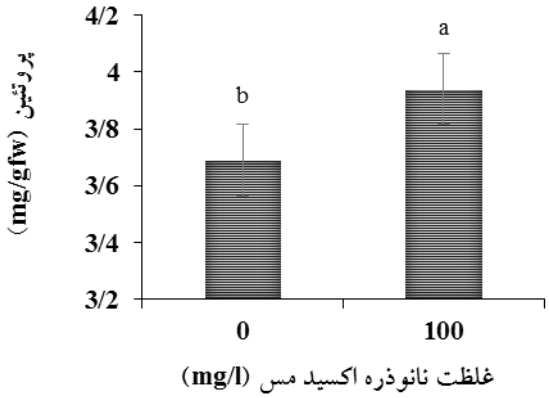
فعالیت پراکسیداز: نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که اثر هیومیک اسید، نانو ذره اکسید مس و اثر متقابل آنها بر آنزیم پراکسیداز در سطح احتمال ۰/۰۵ معنی‌دار بود (جدول ۳). نتایج مقایسه میانگین نشان داد که کمترین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در سطوح صفر هیومیک اسید و نانو ذره (۶۵/۵ میکرو بر میلی‌گرم پروتئین) و بیشترین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز به غلظت‌های ۱۰۰ هیومیک اسید و ۲۰۰۰ نانو ذره اکسید مس (۲۰۲/۷ میکرو بر میلی‌گرم پروتئین) مربوط بود (شکل ۳). مهم‌ترین سازوکارهای هیومیک اسید تولید ایندول استیک اسید، سیتوکنین‌ها با اسیدهای آمینه تریپتوفان و آدنین ترشح‌شده از ریشه، هیدرولیز پیش‌ماده اتیلن (۱- آمینوسیکلوپروپان-۱- کربوکسیلیک اسید) و تولید مواد هورمونی و شبه هورمونی در اثر واکنش نیتریت حاصل از تنفس نیتراتی با آسکوربیک اسید است. بنابراین این ترکیب علاوه بر تأثیر مستقیم با سازوکار تولید مواد تنظیم‌کننده رشد گیاه به‌طور غیرمستقیم با کنترل میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گیاهان تأثیر مفید دارد (Salimon *et al.*, 2012). در این رابطه گزارش شده است که هیومیک اسید باعث افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در برنج می‌شود (Xie *et al.*, 2015).

پروتئین: نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که اثر غلظت هیومیک اسید و نانو ذره اکسید مس بر پروتئین در سطح احتمال ۰/۰۵ معنی‌دار بود (جدول ۳). نتایج نشان داد با افزایش غلظت نانو ذره اکسید مس میزان پروتئین کاهش پیدا کرد. همچنین نشان داده شد که بین شاهد و سایر سطوح اختلاف معنی‌داری وجود دارد به‌طوریکه کمترین میزان پروتئین در تیمار ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر با (۲/۵۶ میلی‌گرم بر گرم برگ تازه) و بیشترین میزان پروتئین در شاهد (۴/۹۲ میلی‌گرم بر گرم برگ تازه) بود که تقریباً دو برابر کاهش را نسبت به شاهد نشان داد (شکل ٤). نتایج مقایسه میانگین اثر هیومیک اسید بر میزان فعالیت پروتئین نشان داد که بین سطوح صفر و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر هیومیک اسید اختلاف معنی‌داری وجود داشت به‌طوریکه بیشترین میزان پروتئین در سطح ۱۰۰

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-07-15]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.18.6]



شکل ٤- مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف نانو ذره اکسید مس بر محتوای پروتئین (میلی‌گرم بر گرم برگ تازه). حروف یکسان بیانگر عدم‌اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از آزمون LSD است.



شکل ۵- مقایسه میانگین اثر اسید هیومیک بر محتوی پروتئین (میلی‌گرم بر گرم برگ تازه). حروف یکسان بیانگر عدم‌اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از آزمون LSD است.

میلی‌گرم در لیتر (۳/۹٤ میلی‌گرم در لیتر) بود که نسبت به سطح صفر هیومیک اسید ۱/۰٦ برابر افزایش نشان داد (شکل ۵). ازجمله نقش‌های هیومیک اسید کلات‌کردن مواد غذایی، حذف عناصر سمی، کاهش نیاز به نیتروژن و بهبود ظرفیت نگه‌داری آب است. این ترکیبات همچنین باعث افزایش میزان پروتئین در برگ می‌شوند و به‌طور مستقیم و غیرمستقیم بر فرایند های فیزیولوژیک گیاه اثر می‌گذارند (Salman *et al.*, 2005).

کاهش محتوی پروتئین تحت اعمال نانو ذره اکسید مس در نتیجه واکنش پروتئین با گونه‌های فعال اکسیژن و درنتیجه تغییر اسید آمینه، افزایش فعالیت آنزیم‌های تجزیه‌کننده پروتئین، کاهش سنتز پروتئین و نیز تجمع اسیدهای آمینه آزاد ازجمله پرولین است (Ranjan *et al.*, 2001). تنش اکسیداتیو می‌تواند یکی دیگر از دلایل کاهش مقدار پروتئین‌ها باشد. تولید گونه‌های فعال اکسیژن نظیر رادیکال‌های سوپراکسید یا هیدروکسیل باعث اکسیداسیون اسیدهای آمینه شده و به ساختار و عملکرد پروتئین‌ها آسیب جدی وارد کرده و به کاهش محتوی پروتئین منجر می‌شود (Turgut *et al.*, 2004).

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به‌دست آمده از این مطالعه می‌توان اظهار داشت که با افزایش شدت تنش نانو ذره اکسید مس شاخص‌های جوانه‌زنی کاهش می‌یابد. با این حال تیمار با هیومیک اسید باعث افزایش شاخص‌های رشدی در گیاه شد و با محافظت گیاه در برابر سمیت نانو ذره اکسید مس باعث کاهش خسارت‌های ناشی از تنش آن گردید. براساس نتایج به‌دست آمده کاهش محتوی پروتئین محلول برگ‌ها و نیز

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-07-15]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.18.6]

افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نشان از آثار سمیت نانو ذره اکسید مس و تولید گونه‌های فعال اکسیژن بود که آسیب‌های اکسیداتیو و کاهش سنتز پروتئین را در پی داشت. افزایش غلظت نانو ذره اکسید مس به افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان منجر شد که این مورد می‌تواند آثاری از مکانیسم تحمل گیاه کلزا در برابر سمیت نانو ذره اکسید مس باشد. همچنین می‌توان اظهار داشت که هیومیک اسید با افزایش فعالیت شبه هورمونی می‌تواند سبب افزایش فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدان گیاه گردد و اثرات سمیت نانو ذره اکسید مس را کاهش دهد. همچنین هیومیک اسید باعث تولید هورمون‌ها، افزایش رشد ریشه و درنتیجه افزایش فعالیت‌های بیوشیمیایی و افزایش تحمل به تنش‌ها می‌شود.

منابع

خواجه پور، م. ر.(۱۳۹۰) گیاهان صنعتی. جلد ٤، جهاد دانشگاهی واحد اصفهان.

نظری،ط.، بارانی مطلق، م.، دردی پور، ا.، قربانی نصرآبادی، ر. و سفیدگر شاهکلایی، س.، (۱۳۹٦) تأثیر روش کاربرد سطوح مختلف هیومیک اسیدبر رشد رویشی و اجزای عملکرد گیاه کلزا (*Brassica napus* L.).نشریه مدیریت خاک و تولید پایدار ۷. ۳۱-۱.

Adhikari, T., Kundu, S., Biswas, A. K., Tarafdar, J. C. and Rao, A. S. (2012) Effect of copper oxide nano particle on seed germination of selected crops. Journal of Agricultural Science and Technology 2: 815.

Babula, P., Klejdus, B., Kovacik, J., Hedbavny, J. and Hlavna, M. (2015) Lanthanum rather than cadmium induces oxidative stress and metabolite changes in *Hypericum perforatum*. Journal of Hazardous Materials. 286: 334-342.

Bandiera, M., Mosca, G. and Vamerali, T. (2009) Humic acids affect root characteristics of fodder radish (*Raphanus sativus* L. var. oleiformis Pers.) in metal-polluted wastes. Desalination 246: 78-91.

Bandyopadhyay, S., Plascencia-Villa, G., Mukherjee, A., Rico, C. M., Jose-Yacaman, M., Peralta-Videa, J. R. and Gardea-Torresdey, J. L. (2015) Comparative phytotoxicity of ZnO NPs, bulk ZnO, and ionic zinc onto the alfalfa plants symbiotically associated with Sinorhizobium meliloti in soil. Science of the Total Environment 515: 60-69.

Beauchamp, C. and Fridovich, I. (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Analytical Biochemistry 44: 276-287.

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

Brown, A. L., Jackson, W. R. and Cavagnaro, T. R. (2014) A meta-analysis and review of plant-growth response to humic substances: practical implications for agriculture. Advances in Agronomy 124: 37-46.

Chakraborty, U. and Pradhan, D. (2011) High temperature-induced oxidative stress in *Lens culinaris*, role of antioxidants and amelioration of stress by chemical pre-treatments. Journal of Plant Interactions 6: 43-52.

Chance, B. and Maehly, A. (1955) Assay of catalases and peroxidases. Methods in Enzymology 2: 764-775.

Cooper, R., Liu, C. and Fisher, D. (1998) Influence of humic substances on rooting and nutrient content of creeping bentgrass. Crop Science 38: 1639-1644.

Cordeiro, F. C., Santa-Catarina, C., Silveira, V. and de Souza, S. R. (2011) Humic acid effect on catalase activity and the generation of reactive oxygen species in corn (*Zea mays*). Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 75: 70-74.

Da Costa, M. and Sharma, P. (2016) Effect of copper oxide nanoparticles on growth, morphology, photosynthesis, and antioxidant response in *Oryza sativa*. Photosynthetica 54: 110-119.

Endalew, A. K., Kiros, Y. and Zanzi, R. (2011) Heterogeneous catalysis for biodiesel production from *Jatropha curcas* oil (JCO). Energy 36: 2693-2700.

Eyheraguibel, B., Silvestre, J. and Morard, P. (2008) Effects of humic substances derived from organic waste enhancement on the growth and mineral nutrition of maize. Bioresource Technology 99: 4206-4212.

Gulser, F., Sonmez, F. and Boysan, S. (2010) Effects of calcium nitrate and humic acid on pepper seedling growth under saline condition. Journal of Environmental Biology 31: 873-876

Hossain, Z., Nouri, M. Z. and Komatsu, S. (2011) Plant cell organelle proteomics in response to abiotic stress. Journal of Proteome Research 11: 37-48.

Inaba, S. and Takenaka, C. (2005) Effects of dissolved organic matter on toxicity and bioavailability of copper for lettuce sprouts. Environment International 31: 603-608.

ISTA. (2005) International rules for seed testing. International Seed Testing Association.

Jamali, Z. S., Astaraei, A. and Emami, H. (2015) Effects of humic acid, compost and phosphorus on growth characteristics of basil herb and concentration of micro elements in plant and soil. Journal of Science and Technology of Greenhouse Culture. 6:185-205.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-07-15]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.18.6]

Kim, S., Lee, S. and Lee, I. (2012) Alteration of phytotoxicity and oxidant stress potential by metal oxide nanoparticles in *Cucumis sativus*. Water, Air, and Soil Pollution 223: 2799-2806.

Lee, S., Kim, S., Kim, S. and Lee, I. (2013) Assessment of phytotoxicity of ZnO NPs on a medicinal plant, Fagopyrum esculentum. Environmental Science and Pollution Research 20: 848-854.

Lin, D. and Xing, B. (2007) Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. Environmental Pollution 150: 243-250.

Mackowiak, C., Grossl, P. and Bugbee, B. (2001) Beneficial effects of humic acid on micronutrient availability to wheat. Soil Science Society of America Journal 65: 1744-1750.

Malik, K. A. and Azam, F. (1985) Effect of humic acid on wheat (*Triticum aestivum* L.) seedling growth. Environmental and Experimental Botany 25: 245-252.

Miralles, P., Church, T. L. and Harris, A. T. (2012) Toxicity, uptake, and translocation of engineered nanomaterials in vascular plants. Environmental Science and Technology 46: 9224-9239.

Mittler, R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Science 7: 405-410.

Moon, Y. S., Park, E. S., Kim, T. O., Lee, H. S. and Lee, S. E. (2014) Seldi-tof ms-based discovery of a biomarker in *Cucumis sativus* seeds exposed to CuO nanoparticles. Environmental Toxicology and Pharmacology 38: 922-931.

Nair, P. M. G. and Chung, I. M. (2015) Study on the correlation between copper oxide nanoparticles induced growth suppression and enhanced lignification in Indian mustard (*Brassica juncea* L.). Ecotoxicology and Environmental Safety 113: 302-313.

Nakano, Y. and Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant and Cell Physiology 22: 867-880.

Nikbakht, A., Kafi, M., Babalar, M., Xia, Y. P., Luo, A. and Etemadi, N. a. (2008) Effect of humic acid on plant growth, nutrient uptake, and postharvest life of gerbera. Journal of Plant Nutrition 31: 2155-2167.

Pizzeghello, D., Francioso, O., Ertani, A., Muscolo, A. and Nardi, S. (2013) Isopentenyladenosine and cytokinin-like activity of different humic substances. Journal of Geochemical Exploration 129: 70-75.

Rajapaksha, A. U., Ahmad, M., Vithanage, M., Kim, K. R., Chang, J. Y., Lee, S. S. and Ok, Y. S. (2015) The role of biochar, natural iron oxides, and nanomaterials as soil amendments for immobilizing metals in shooting range soil. Environmental Geochemistry and Health 37: 931-942.

Ranjan, R., Bohra, S., Asija, M. J. and Bohra, S. (2001) Plant senescence: Physiological, Biochemical and Molecular Aspects. Agrobios, Jodhpur, India.

Remon, E., Bouchardon, J. L., Cornier, B., Guy, B., Leclerc, J. C. and Faure, O. (2005) Soil characteristics, heavy metal availability and vegetation recovery at a former metallurgical landfill: Implications in risk assessment and site restoration. Environmental Pollution 137: 316-323.

Safiuddin, M., Gonzalez, M., Cao, J. and Tighe, S. L. (2014) State-of-the-art report on use of nano-materials in concrete. International Journal of Pavement Engineering 15: 940-949.

Salimon, J., Salih, N. and Yousif, E. (2012) Biolubricant basestocks from chemically modified ricinoleic acid. Journal of King Saud University-Science 24: 11-17.

Salman, S., Abou-Hussein, S., Abdel-Mawgoud, A. and El-Nemr, M. (2005) Fruit yield and quality of watermelon as affected by hybrids and humic acid application. Journal of Applied Sciences Research 1: 51-58.

Sinha, A. K. (1972) Colorimetric assay of catalase. Analytical Biochemistry 47: 389-394.

Thwala, M., Musee, N., Sikhwivhilu, L. and Wepener, V. (2013) The oxidative toxicity of Ag and ZnO nanoparticles towards the aquatic plant Spirodela punctuta and the role of testing media parameters. Environmental Science: Processes and Impacts 15: 1830-1843.

Turgut, C., Pepe, M. K. and Cutright, T. J. (2004) The effect of EDTA and citric acid on phytoremediation of Cd, Cr, and Ni from soil using *Helianthus annuus*. Environmental Pollution 131: 147-154.

Wang, S., Liu, H., Zhang, Y. and Xin, H. (2015) The effect of CuO NPs on reactive oxygen species and cell cycle gene expression in roots of rice. Environmental Toxicology and Chemistry 34: 554-561.

Xie, P. P., Deng, J. W., Zhang, H. M., Ma, Y. H., Cao, D. J., Ma, R. X., Liu, R. J., Liu, C. and Liang, Y. G. (2015) Effects of cadmium on bioaccumulation and biochemical stress response in rice (*Oryza sativa* L.). Ecotoxicology and Environmental Safety 122: 392-398.

Xu, P. L., Guo, Y. K., Bai, J. G., Shang, L. and Wang, X. J. (2008) Effects of long-term chilling on ultrastructure and antioxidant activity in leaves of two cucumber cultivars under low light. Physiologia Plantarum 132: 467-478.

Yadollahi, P., Asgharipour, M. R. and Golshani, F. (2016) Effect of foliar application of humic acid on aloe vera (*Aloe vera* L.) in cadmium contaminated soil. Journal of Plant Process and Function 4: 51-60.

Zhang, X. and Ervin, E. (2004) Cytokinin-containing seaweed and humic acid extracts associated with creeping bentgrass leaf cytokinins and drought resistance. Crop Science 44: 1737-1745.

Zhang, Y., Chen, Y., Westerhoff, P., Hristovski, K. and Crittenden, J. C. (2008) Stability of commercial metal oxide nanoparticles in water. Water Research 42: 2204-2212.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-07-15]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.18.6]

Effect of humic acid on germination indices and antioxidant enzymes of canola seed (*Brassica napus* L.) under the influence of toxicity of nanoparticles of copper oxide

Afsaneh Yarmohammadi, Mahmoud Khorrami vafa *, Saeid Jalali Honarmand

Department of Production and Plant Genetics, Faculty of Agriculture, Razi University of Kermanshah
(Received: 26/02/2018, Accepted: 18/07/2018)

Abstract

Concerns about nanoparticles environmental pollution risk have been increasing globally due to increasing in production of nanoparticles in recent years and their use in diverse cases such as medical, imaging, catalysts, semiconductors, cosmetics, microelectronics, various material coatings etc. The purpose of this experiment was to determine the effects of copper oxide nanoparticle on some antioxidant enzymes, protein and germination indices of canola seeds and also to study the humic acid effects on reducing of nanoparticles toxicity in laboratory conditions. Then, an experiment was conducted to investigate the effects of copper oxide nanoparticle in 9 concentrations of 0, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750, 2000 $mg.L^{-1}$ and humic acid in two concentrations of 0 and 100 $mg.L^{-1}$ in a factorial experiment as completely randomized design with three replications. The results showed that increasing the concentration of copper oxide nanoparticle resulted in rising the activity of all four enzymes i.e. superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, catalase, and peroxidase 5, 2.19, 2 and 2.35 times respectively, and decreasing the protein content twice as much. Also, germination indices including radicle length, plumule length were decreased 39.00 and 6.56 time, respectively. Humic acid application increasing the toxicity effects of copper oxide nanoparticles, especially at 2000 $mg.L^{-1}$, so that the radical and plumule length, radical and plumule fresh weight were 9.68 and 3.0, 6.0 and 5.50 times than of the control respectively. It can be stated that humic acid can increase the activity of antioxidant enzymes and increase plant growth by increasing pseudo-hormonal activity.

Key words: Biochemical activity, Contamination, Final Germination percentage, Oily plants, Nanoparticles, Natural organic matter

Corresponding author, Email: Khoramivafa@gmail.com

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-07-15]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.18.6]