

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: ۱۳۹۶/۱۲/۰۷، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۷/۰۴/۲۷)

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 به وجود 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. از این رو آزمایشی در مرحله جوانه‌زنی گیاه کلزا (رقم اکاپی) به منظور 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 به صورت 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 به ترتیب 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، به ترتیب ۳۹/۰ و ۶/۵۶ برابر کاهش یافت. کاربرد هیومیک اسید باعث کاهش اثرات سمیت ناشی از نانو ذره اکسید مس به ویژه در سطح ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر گردید، به طوری که میزان طول ریشه‌چه، ساقه‌چه، وزن تر ریشه‌چه و ساقه‌چه به ترتیب ۹/۶۸، ۳/۰۹ و ۶/۰۳ 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

افزایش قابل توجهی در تولید نانو ذرات مهندسی شده منجر شده است (Rajapaksha et al., 2015). نانو ذرات به دو دسته کلی تقسیم‌بندی می‌شوند: مهندسی شده و غیر مهندسی. نانو ذرات غیر مهندسی به میزان زیادی در طبیعت وجود دارند و در بسیاری از فرایندهای طبیعی مانند واکنش‌های فتوشیمیایی،

فناوری نانو به طور گسترده‌ای در صنایع غذایی، علوم پزشکی، کشاورزی و غیره در سراسر جهان مورد استفاده قرار گرفته است (Safiuddin et al., 2014). اگرچه نانو ذرات به طور طبیعی در محیط وجود دارند؛ ولی استفاده از فناوری نانو به

غذایی - دارویی مهم در جهان است. امروزه کلزا به خاطر بذرهايش كشت مي‌شود چرا كه بذرهاي اين گياه بين ۳۵-۴۵ درصد روغن دارد درنتيجه مصرف خوراكي آن بيشتر از ساير موارد مصرفي اين گياه است. البته مصارف صنعتي روغن كلزا زياد است و احتمالاً اهميت بيشترى نيز پيدا خواهد كرد (خواجه پور، ۱۳۹۰). گياه كلزا در ليست گياهان پيشنهادشده براي تحقيقات اثر سميت نانو ذرات است كه از طرف بخش محيط، بهداشت و ايمني سازمان همكاري و توسعه اقتصادي (Organization for Economic Co-operation and Development-OECD) و سازمان حفاظت محيط زيست آمريكا (-United States Environmental Protection Agency-USPA) (Miralles *et al.*, 2012) نيز وجود دارد.

فناوري نانو در کنار فناوري زيستي و فناوري اطلاعات موج ديگري از انقلاب صنعتي را در جهان رقم زده است. ايران اكنون درزمينه توليد علوم نانو در رتبه هفتم جهان قرار دارد و جزء ۱۵ كشور برتر دنيا در حوزه فناوري نانو است. همچنين در ايران طي ۱۰ سال گذشته ۱۶۳ شركت توليدكننده محصولات و تجهيزات مبتني بر فناوري نانو تاسيس شده‌اند. ايران طي سال‌هاي اخير رشد چشمگيري در حوزه فناوري نانو داشته است كه با افزايش ميزان توليدات فناوري نانو و استفاده بيش از حد از كودهاي شيميايي زمينه براي ورود اين ذرات به محيط زيست فراهم خواهد شد. همچنين به دليل 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 بيش از ۱۰۰۰ ميلي گرم مس بر کیلوگرم اثرهاي تقويت‌کنندگي روي رشد گياه داشته و سبب افزايش وزن خشك اندام هوايي تريچه شد (Bandiera *et al.*, 2009). مطالعات نشان داد كه افزودن هیومیک اسید باعث کاهش جذب مس شده است (Inaba and Takenaka, 2005; Remon *et al.*, 2005). برخي تحقيقات گزارش كردند كه سطوح مختلف محلول پاشي هیومیک اسید باعث افزايش ميزان

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

نانو ذرات پس از انحلال به‌عنوان یون‌های فلزی عمل کرده كه با گروه سولفیدریل و كربوكسیل پروتئين‌ها ارتباط برقرار می‌کنند و درنتيجه فعاليت آنها را تغيير می‌دهند. مس به‌عنوان يك فلز سمی قادر به انتقال الكترون به مولكول‌های اكسيژن براي تشكيل سوپر اكسيدهای واكنشي است اين سميت ناشی از نانو ذره به عدم تعادل توليد گونه‌های فعال اكسيژن منجر می‌شود (Thwala *et al.*, 2013). همچنين گياهان مجهز به آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی هستند كه سيستم‌های دفاعی براي محافظت از سلول‌ها در مقابل آسیب اكسیداتیو و گونه‌های فعال اكسيژن است (Hossain *et al.*, 2011).

هیومیک اسید شامل مخلوطی از ترکیبات آلی مختلف است كه از باقی‌مانده اجزای گياهان و حيوانات حاصل می‌شود، و از آنجا كه اين ماده pH اسیدی ضعيف (۵ - ۳/۸) دارد به‌نام هیومیک اسید شناخته شده است. هیومیک اسید به‌دلیل اثرات هورمونی در بهبود جذب مواد غذایی و افزايش بیوماس ریشه، شاخساره مانند يك 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 كه نقش مهمی در کاهش اثرات سمیت نانو ذرات دارد (Zhang *et al.*, 2008). مکانیسم عمل مواد آلی طبیعی بر تحريك رشد گياهان مختلف به‌طور دقيق مشخص نیست، ولی در برخی منابع بر دو اثر مستقیم (افزايش فعاليت آنزیمی و نفوذپذیری غشا) و غیرمستقیم (جذب بهتر مواد غذایی) اشاره شده است (Jamali *et al.*, 2015). برخی محققان بر این باورند كه مواد آلی طبیعی مانند هیومیک اسید و ورمی‌کمپوست برای پاک‌سازی فلزات از خاک گزینه مناسبی هستند. طی بررسی‌هایی نشان دادند كه اصلاح‌کردن خاک‌های آلوده با مواد آلی طبیعی تحريك فلزات را کاهش می‌دهد (Pizzeghello *et al.*, 2013).

كلزا (*Brassica napus*) از خانواده Brassicaceae و سومین منبع روغن گیاهی پس از نخل و سویا و یک منبع مواد

(EURO SOLIDS) با نام تجاری HURO HUMIC گرانول محلول در آب دارای ۶۸٪ 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 آب مقطر 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 آب مقطر استریل‌شده، در پتری‌دیش قرار داده شدند و ۵ میلی‌لیتر از نانو ذره اکسید مس و هیومیک اسید به پتری‌دیش اضافه و سپس پتری‌دیش‌های حاوی بذور به ژرminatور 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 از جمله: طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه و وزن تر 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 طول موج ۲۹۰nm پس از مدت یک دقیقه با دستگاه الایزا (Biotek Power Wave xs₂) خوانده شد (Nakano and

Endalew et al., 2011). پژوهشگران در تحقیقی اثر هیومیک اسید را بر روی فلغل بررسی نمودند نتایج تحقیق آنها نشان داد که هیومیک اسید باعث افزایش وزن تر 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

(Asada, 1981).

و پس از گذشت ۵ دقیقه، میزان جذب نوری آن در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده در نهایت محتوای پروتئین در نمونه با توجه به جذب نمونه و با استفاده از منحنی استاندارد به دست 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 اسید و 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

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 طول موج ۴۷۰nm خوانده گردید (Chance and Maehly, 1955).

جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز ۵۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی رقیق‌شده با ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار $\text{pH} = 7$ مخلوط و واکنش با اضافه‌کردن ۵۰۰ میکرو لیتر محلول هیدروژن پراکسید ۶۰ میلی‌مولار آغاز گردید. پس از گذشت زمان معین با ۲ میلی‌لیتر معرف دی‌کرومات (۰/۵٪)، 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 الیزا در طول موج 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 ۴ میلی‌لیتر محلول اندازه‌گیری سوپراکسید دیسموتاز که شامل ۵۰ میلی‌مول بافر فسفات پتاسیم با $\text{pH} = 7$ ، ۷۵ میکرومولار نیترو بلو تترازولیم، ۱۳ میلی‌مولار EDTA و ۰/۱ میلی‌مولار L-Metionin ، ۲ میکرومولار ریپوفلاوین بود، مخلوط گردید. سپس دو نمونه بدون عصاره حاوی ۲۰۰ میکرولیتر بافر استخراج به‌عنوان کنترل و بلائک 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 الیزا در طول موج ۵۶۰nm 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

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس برخی شاخص‌های جوانه‌زنی

میانگین مربعات				درجه آزادی	منابع تغییر
وزن تر ساقه‌چه	وزن تر ریشه‌چه	طول ساقه‌چه	طول ریشه‌چه		
۶۲۴۲۴ *	۸۱۶/۶ *	۵۰۳۷/۱۰ *	۹۹۴/۱۶ *	۱	هیومیک اسید
۱۰۰۳۵/۹ *	۵۱۷/۳ *	۱۱۳۰/۸۳ *	۳۱۷۰/۵۲ *	۸	اکسید مس
۹۰۷/۵ *	۲۸/۶ *	۱۱۲/۱۴ *	۱۱/۹۱ *	۸	هیومیک اسید × اکسید مس
۴۴/۴۲	۱/۶۲	۳/۰۶	۰/۸۸۲	-	خطا
۹/۲۱	۱۱/۱۱	۶/۹۰	۶/۱۶	-	ضریب تغییرات

* و ns به ترتیب معنی‌داری و عدم معنی‌داری در سطح احتمال ۰/۰۵ را نشان می‌دهد.

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

وزن تر ساقه‌چه (میلی‌گرم)	وزن تر ریشه‌چه (میلی‌گرم)	طول ساقه‌چه (میلی‌متر)	طول ریشه‌چه (میلی‌متر)	اکسید مس (میلی‌گرم در لیتر)	هیومیک اسید (میلی‌گرم در لیتر)
۱۶۵ ^a	۲۸ ^b	۵۸/۶ ^a	۷۲/۶۶ ^b	۰	۰
۴۵/۶ ^g	۷ ^{fg}	۱۳ ^e	۴ ^f	۲۵۰	۰
۳۰/۳ ^h	۵/۶ ^{gh}	۱۳ ^e	۳/۶۶ ^{gf}	۵۰۰	۰
۲۴ ^{hi}	۵/۳ ^{gh}	۱۰ ^f	۳/۶۰ ^{gf}	۷۵۰	۰
۱۹ ^{hi}	۵ ^{gh}	۹/۶۰ ^f	۳/۵۰ ^{gf}	۱۰۰۰	۰
۱۶ ⁱ	۴/۶ ^h	۹/۲۰ ^f	۳/۴۶ ^{gf}	۱۲۵۰	۰
۱۵ ⁱ	۴/۶ ^h	۹/۱ ^f	۳/۳۳ ^{gh}	۱۵۰۰	۰
۱۴/۳ ⁱ	۴ ^h	۹ ^f	۲/۳۳ ^{gh}	۱۷۵۰	۰
۱۴ ⁱ	۴ ^h	۸/۹۳ ^f	۲ ^h	۲۰۰۰	۰
۱۷۸/۳ ^b	۴۲/۳ ^a	۶۱/۳ ^a	۸۰ ^a	۰	۱۰۰
۱۵۲/۶ ^c	۲۲/۳ ^c	۴۲ ^b	۱۶/۳۳ ^c	۲۵۰	۱۰۰
۱۰۷/۳ ^d	۱۳/۶ ^d	۴۰ ^b	۱۶ ^c	۵۰۰	۱۰۰
۱۰۶/۳ ^d	۱۳/۳ ^d	۴۰ ^b	۱۵ ^c	۷۵۰	۱۰۰
۹۰ ^e	۱۲/۳ ^d	۲۸ ^c	۱۳ ^d	۱۰۰۰	۱۰۰
۸۲/۳ ^e	۱۰ ^e	۲۷ ^{dc}	۹/۴۰ ^e	۱۲۵۰	۱۰۰
۸۱/۶ ^{ef}	۹ ^{fe}	۲۶ ^{dc}	۹/۳۳ ^e	۱۵۰۰	۱۰۰
۸۱/۳ ^{ef}	۸/۳ ^{fe}	۲۵ ^d	۸/۴۶ ^e	۱۷۵۰	۱۰۰
۷۶/۶ ^f	۷ ^f	۲۴ ^d	۸/۲۶ ^e	۲۰۰۰	۱۰۰
۱۱/۰۳	۲/۱۱	۲/۸۹	۱/۵۵	-	LSD

حرف یا حروف مشابه در هر ستون نشانگر عدم اختلاف 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 (۶۱/۳) میلی‌متر) اتفاق افتاد.

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، ۱۳۹۶). 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 در نتیجه 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 به طوری 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 ۴/۵۳ میکرو بر میلی‌گرم پروتئین) مشاهده شد؛ به عبارت 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 (۱۴/۳۷ 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

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، فلدوکسین‌ها، پلاستوسیانین‌ها و آنزیم رویسکو می‌شود و از این راه رشد را افزایش می‌دهد (Brown *et al.*, 2014).

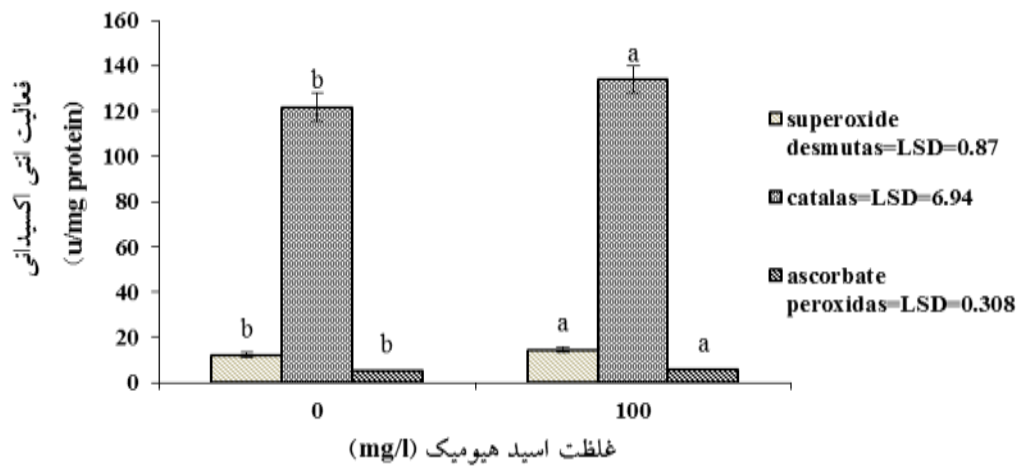
وزن‌تر ریشه‌چه: نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که اثر هیومیک اسید، نانو ذره اکسید مس و اثر متقابل آنها بر وزن‌تر ریشه‌چه در سطح احتمال ۰/۰۵ معنی‌دار بود (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین نشان داد که کمترین میزان وزن‌تر ریشه‌چه در سطح صفر هیومیک اسید و سطح ۲۰۰۰ نانو ذره اکسید مس (۴ میلی‌گرم) بود همچنین بیشترین میزان وزن‌تر ریشه‌چه در سطح ۱۰۰ هیومیک اسید و سطح صفر نانو ذره اکسید مس (۴۲/۳ 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 (۱۴ میلی‌گرم) بود همچنین بیشترین میزان وزن‌تر

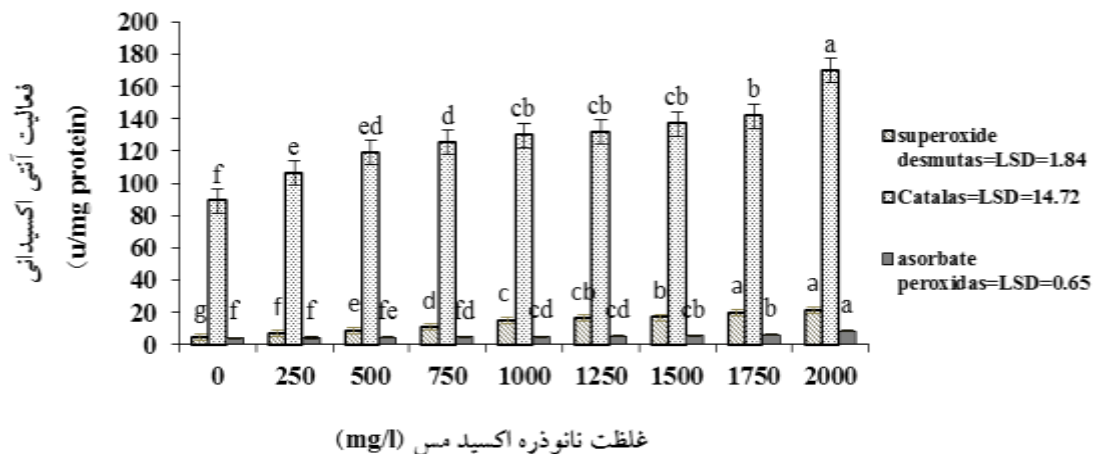
جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

میانگین مربعات					درجه آزادی	منابع تغییر
پروتئین	سوپراکسید دیسموتاز	پراکسیداز	آسکوربات پراکسیداز	کاتالاز		
۰/۸۷۳*	۷۱/۰۶۹*	۹۶۱۴/۱۷*	۳/۲۵۶*	۱۹۷۷/۳۴*	۱	هیومیک اسید
۳/۰۱۵*	۲۰۸/۶۱۹*	۹۰۴۷/۶۶*	۱۲/۵۹*	۳۰۸۵/۳۲*	۸	اکسید مس
۰/۰۷۱ ^{ns}	۴/۶۷ ^{ns}	۱۱۸۵/۷۲*	۰/۱۰ ^{ns}	۹۷/۷۸ ^{ns}	۸	هیومیک اسید × اکسید مس
۰/۱۵۷	۲/۴۹	۸۴/۶۱	۰/۳۱	۱۵۸/۲	-	خطا
۱۰/۳۸	۱۱/۹۲	۷/۷۹	۱۰/۷۱	۹/۸۴	-	ضریب تغییرات

* و ns به ترتیب معنی داری و عدم معنی داری 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 عدم اختلاف معنی دار 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 آنتی‌اکسیدانی (میکرو بر میلی‌گرم پروتئین)

ماهیت آنزیم‌ها، اکسیداسیون لیپیدها و آسیب به DNA می‌شود. سوپراکسید دیسموتاز اولین آنزیم در فرآیند سمیت زدایی

تجزیه می‌کند. سوپراکسید به‌عنوان یکی از گونه‌های اصلی اکسیژن واکنش‌گر در سلول شناخته شده است که سبب تغییر

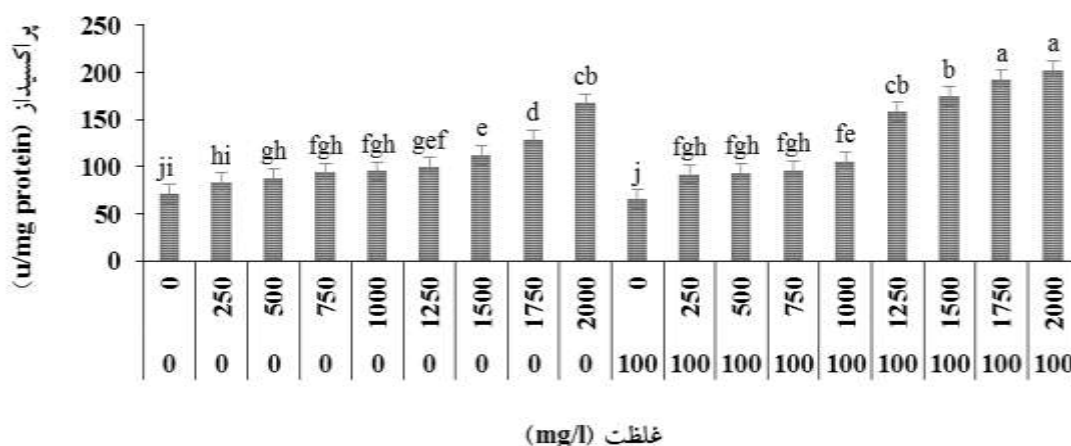
برای تشکیل سوپراکسیدهای واکنشی است؛ این سمیت ناشی از نانو ذره منجر به عدم تعادل تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود (Thwala et al., 2013). گزارش شده است نانو ذرات باعث افزایش میزان تنش اکسیداتیو در خیار و برنج شده‌اند (Thwala et al., 2013). در این رابطه اظهار شده است که گیاهان به آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی 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 سوپراکسید 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 (۸/۶۴ میکرو بر میلی‌گرم پروتئین) 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 (۵/۴۵ میلی‌گرم در لیتر) بود که نسبت به سطح صفر هیومیک اسید

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 از جمله 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 در نتیجه فعالیت آنها را تغییر می‌دهند. مس به‌عنوان یک فلز سمی قادر به انتقال الکترون به مولکول‌های اکسیژن



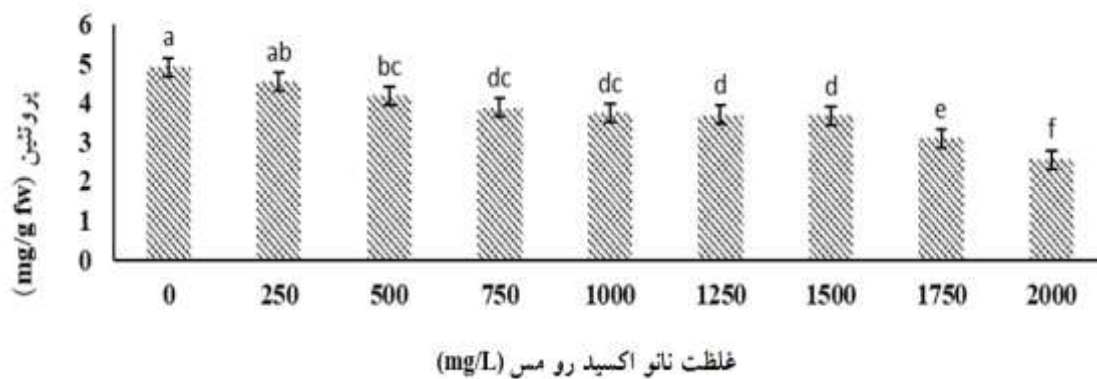
شکل ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل اسید هیومیک و اکسید مس بر میزان فعالیت پراکسیداز (میکرو بر میلی گرم پروتئین). حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از آزمون LSD است.

آمینوسیکلوپروپان-۱- کربوکسیلیک اسید) و تولید مواد هورمونی و شبه هورمونی در اثر واکنش نیتريت حاصل از تنفس نیتراتی با آسکوربیک اسید است. بنابراین این ترکیب علاوه بر تأثیر مستقیم با سازوکار تولید مواد تنظیم کننده رشد گیاه به طور غیرمستقیم با کنترل میزان فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی گیاهان تأثیر مفید دارد (Salimon et al., 2012). در این رابطه گزارش شده است که هیومیک اسید باعث افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در برنج می شود (Xie et al., 2015).

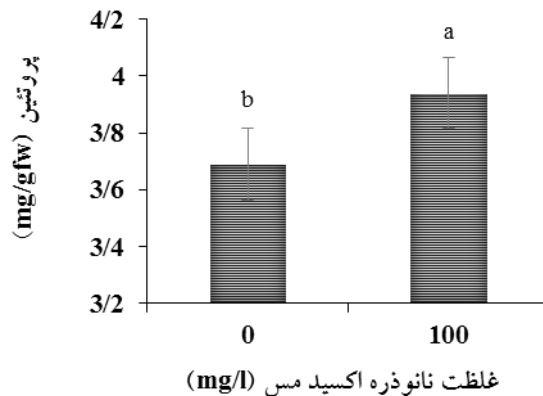
پروتئین: نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که اثر غلظت هیومیک اسید و نانو ذره اکسید مس بر پروتئین در سطح احتمال ۰/۰۵ معنی دار بود (جدول ۳). نتایج نشان داد با افزایش غلظت نانو ذره اکسید مس میزان پروتئین کاهش پیدا کرد. همچنین نشان داده شد که بین شاهد و سایر سطوح اختلاف معنی داری وجود دارد به طوری که کمترین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

یک برابر افزایش نشان داد (شکل ۱). برخی از گزارش ها نیز فعالیت های شبه هورمونی از جمله 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 کرده اند (Cooper et al., 1998). مشابه با یافته های این آزمایش، آنزیم آسکوربات پراکسیداز تحت تأثیر کادمیوم افزایش یافت (Babula et al., 2015; Mittler, 2002). آسکوربات پراکسیداز با کمک آسکوربیک اسید باعث حذف گونه های فعال اکسیژن می شود لذا بالاتر بودن فعالیت این آنزیم به معنی حذف بیشتر رادیکال های 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 معنی دار 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 میلی گرم پروتئین) و بیشترین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز به غلظت های ۱۰۰ هیومیک اسید و ۲۰۰۰ نانو ذره اکسید مس (۲۰۲/۷ میکرو بر میلی گرم پروتئین) مربوط بود (شکل ۳). مهم ترین سازوکارهای هیومیک اسید تولید ایندول استیک اسید، سیتوکینین ها با اسیدهای آمینه تریپتوفان و آدنین ترشح شده از ریشه، هیدرولیز پیش ماده اتیلن (۱-)



شکل ۴- مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف نانو ذره اکسید مس بر محتوای پروتئین (میلی‌گرم بر گرم برگ تازه). حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از آزمون LSD است.



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

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 محتوای 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 محتوای پروتئین محلول برگ‌ها و نیز

میلی‌گرم در لیتر (۳/۹۴ میلی‌گرم در لیتر) بود که نسبت به سطح صفر هیومیک اسید ۱/۰۶ 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 فرایند‌های فیزیولوژیک گیاه اثر می‌گذارند (Salman et al., 2005).

کاهش محتوای پروتئین تحت اعمال نانو ذره اکسید مس در نتیجه واکنش پروتئین با گونه‌های فعال اکسیژن و در نتیجه تغییر اسید آمینه، افزایش فعالیت آنزیم‌های تجزیه‌کننده پروتئین، کاهش سنتر 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.

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 در نتیجه افزایش فعالیت‌های بیوشیمیایی و افزایش تحمل به تنش‌ها می‌شود.

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.

منابع

- خواجه پور، م. ر. (۱۳۹۰) گیاهان صنعتی. جلد ۴، جهاد دانشگاهی واحد اصفهان.
- نظری، ط.، بارانی مطلق، م.، دردی پور، ا.، قربانی نصرآبادی، ر. و سفیدگر شاهکلاپی، س.، (۱۳۹۶) تأثیر روش کاربرد سطوح مختلف هیومیک اسید بر 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 Vamerli, 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-Yacamán, 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., Astarai, 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.

- 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 punctata* 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.

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