

برهمکنش نانو ذره اکسید روی و اسید هیومیک بر جوانه‌زنی بذر گیاه کلزا (*Brassica napus* L.)

افسانه یارمحمدی، محمود خرمی‌وفا*، سعید جلالی هنرمند

گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۲/۲۲، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۷/۰۸/۰۵)

چکیده

اسید هیومیک با اتصال به سموم زیستی مختلف می‌تواند سمیت و تحرک آنها را در محیط‌های مختلف تغییر دهد؛ بنابراین اثر متقابل نانو ذرات و اسید هیومیک از دیدگاه زیست‌محیطی به‌طور خاص مورد توجه است. هدف از این پژوهش بررسی اثر سمیت نانو ذره اکسید روی بر گیاه کلزا در مرحله جوانه‌زنی و همچنین بررسی اثرات اسید هیومیک بر کاهش سمیت این نانو ذره در محیط آزمایشگاه بود. آزمایش با نه غلظت نانو ذرات اکسید روی شامل صفر، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰، ۱۰۰۰، ۱۲۵۰، ۱۵۰۰، ۱۷۵۰، ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر و اسید هیومیک در دو غلظت صفر، 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 روی، میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز و پراکسیداز افزایش یافت در حالیکه میزان پروتئین روندی کاهشی را نشان داد. کاربرد اسید هیومیک باعث کاهش اثرات سمیت ناشی از نانو ذره اکسید روی شد. با افزایش غلظت نانو ذره اکسید روی، شاخص‌های جوانه‌زنی (درصد نهایی جوانه‌زنی، انرژی جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی و شاخص بنیه بذر) کاهش یافت. با این حال تیمار با اسید هیومیک باعث افزایش شاخص‌های جوانه‌زنی و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدان در گیاه شد و با محافظت گیاه در برابر سمیت نانو ذرات اکسید روی، باعث کاهش خسارت‌های ناشی از سمیت آن گردید.

کلیدواژه: آلودگی محیط‌زیست، شاخص‌های جوانه‌زنی، گیاهان روغنی، فعالیت بیوشیمیایی، مواد آلی طبیعی

مقدمه

آزادسازی آنها به بسیاری از اکوسیستم‌های محیطی مختلف خواهد شد مؤید لزوم تحقیق در مورد اثرات آنها بر روی موجودات زنده از جمله گیاهان است. برآورد شده است که تولید نانو ذرات فلز و اکسید فلزی یک روند افزایشی دارد و احتمالاً روز به روز افزایش خواهد یافت و از ۲۰۰۰ تن در سال ۲۰۰۲ به بیش از ۵۸۰۰۰ تن در سال ۲۰۲۰ خواهد رسید (Stoimenov et al., 2002). نانو ذرات اکسید روی در لیست نانو ذرات پیشنهادشده برای تحقیقات که از طرف بخش

نانو ذرات اکسید روی در ساخت دارو، خمیر دندان، شامپو، ضدآفتاب، صابون، لوازم آرایشی-بهداشتی، کشاورزی، پزشکی، نیمه‌رساناها و کاتالیزورها استفاده می‌شود بنابراین به محیط‌زیست وارد شده و می‌تواند توسط گیاهان جذب شود و یکی از پرکاربردترین و پرمصرف‌ترین نانو ذرات است (Pokhrel and Dubey, 2013). این حجم بالای استفاده از نانو ذره اکسید روی در بسیاری از صنایع مصرفی که منجر به

سطوح مختلف محلول پاشی اسید هیومیک باعث افزایش میزان آنتی اکسیدان‌ها از جمله کاتالاز شد (Endalew *et al.*, 2011). هدف از اجرای این آزمایش، بررسی تأثیر اسید هیومیک بر فعالیت بیوشیمیایی و جوانه زنی بذر کلزا در شرایط اعمال نانو ذرات اکسید روی و بررسی اثر اسید هیومیک در کاهش اثر سمیت نانو ذرات اکسید روی در مراحل اولیه جوانه زنی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و شاخص‌های جوانه زنی بود.

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی اثرات نانو ذرات اکسید روی (NP-ZnO) (جدول ۱) و نقش اسید هیومیک در کاهش سمیت آن روی گیاه کلزا (*Brassica napus* L.)، رقم اکاپی آزمایشی در آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهان زراعی گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی کرمانشاه به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در سال ۱۳۹۵ انجام گرفت. عامل‌ها عبارت از نانو ذرات اکسید روی (NP-ZnO) در ۹ غلظت (صفر، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰، ۱۰۰۰، ۱۲۵۰، ۱۵۰۰، ۱۷۵۰، ۲۰۰۰ میلی گرم در لیتر) و اسید هیومیک در ۲ غلظت (صفر، ۱۰۰ میلی گرم در لیتر) بودند. جهت تهیه غلظت‌های مورد نظر، نانو ذره اکسید روی (شکل ۱)، در آب مقطر با کمک دستگاه حمام اولتراسونیک (مدل Heating - ساخت شرکت James) به مدت ۳۰ دقیقه و دمای ۵۰ درجه سانتی گراد برای حصول محلولی یکنواخت و همگن، حل شد (Adhikari *et al.*, 2012).

آزمون جوانه زنی استاندارد بر اساس دستورالعمل انجمن بین‌المللی آزمون بذر اجرا شد (ISTA, 2005). برای این منظور ۲۵ عدد بذر کلزا تهیه شده از مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه، پس از ضد عفونی با محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت ۶۰ ثانیه و سه بار شستشو با آب مقطر استریل شده، در پتری دیش قرار داده شدند و ۵ میلی لیتر از نانو ذرات اکسید روی و اسید هیومیک به پتری دیش اضافه و سپس پتری دیش‌های حاوی بذور به ژرمیناتور با دمای ۲۵ درجه سانتی گراد منتقل گردید تا مراحل

محیط، بهداشت و ایمنی سازمان همکاری و توسعه اقتصادی (OECD) ارائه می شود نیز وجود دارد (Hernandez-Viezcas *et al.*, 2011). گیاهان در معرض محیط‌های خاکی، آبی و هوایی هستند بنابراین نانو ذرات توسط سطوح گیاهی جذب شده به دنبال آن به درون گیاه راه یافته و در آنجا باقی می ماند و بدین طریق وارد چرخه غذایی می شوند (Dietz and Herth, 2011).

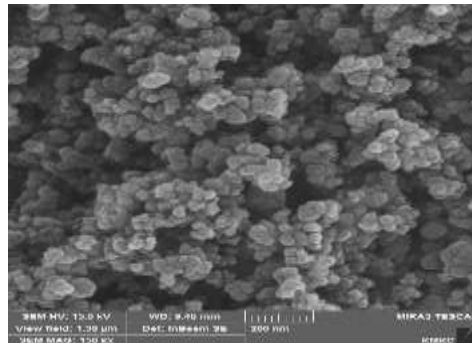
نتایج محدودی درباره پیامدهای زیستی در ارتباط با جذب نانو ذرات توسط گیاهان وجود دارد و سؤالات بسیاری درباره سرنوشت و رفتار نانو ذرات در گیاهان باقی مانده است (Ma *et al.*, 2010).

اسید هیومیک با اتصال به سموم زیستی مختلف می تواند سمیت و تحرک آنها را در محیط‌های مختلف تغییر دهد؛ بنابراین اثر متقابل نانو ذرات و اسید هیومیک از دیدگاه محیط زیستی به طور خاص مورد توجه است. برخی مواد آلی طبیعی اسید فولیک و صمغ عربی باعث شده اند که جذب و سرعت تجمع نانو ذره اکسید سریم (CeO_2) توسط ریشه‌ها به طور چشمگیری کاهش یابد و جذب نانو ذرات توسط مواد آلی طبیعی مهار، در عین حال جذب نانو ذرات در شاخه‌های کدوتنبل را کاهش داد. بدین ترتیب افزودن مواد آلی به خاک به منظور کاهش سمیت فلزات، می تواند یکی از روش‌های اصولی و مطمئن باشد (Schwabe *et al.*, 2013). بدین ترتیب به نظر می رسد بهره گیری از مواد آلی به دلیل هزینه کم، فراوانی بالا و وجود گروه‌های عاملی از قبیل هیدروکسیل، کربوکسیل و فنل میل ترکیبی قوی با فلزات، راه کار مناسبی برای کاهش سمیت نانو ذرات باشد (Pizzeghello *et al.*, 2013).

غلظت ۵۴ میلی گرم در لیتر اسید هیومیک باعث افزایش سرعت جوانه زنی، طول و وزن خشک ریشه چه گندم شد (سبزواری و همکاران، ۱۳۸۹). طی یک بررسی نشان داده شد که اسید هیومیک باعث افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه زنجبیل می شود (Ghasemzadeh *et al.*, 2011). گزارش کردند که اثر اسید هیومیک باعث افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در برنج می شود (Xie *et al.*, 2015). همچنین

جدول ۱- خصوصیات نانو ذرات مصرفی

ویژگی	اکسید روی (Zno)
خلوص (%)	۹۹٪
اندازه ذرات (نانومتر)	۱۰-۳۰
رنگ	سفید
محصول	US NANO امریکا



شکل ۱- تصویر TEM نانو ذرات اکسید روی

$$\text{Rate Germination (number/day)} = \sum N/T$$

N = تعداد بذره‌های جوانه‌زده در هر شمارش، T = تعداد روز تا شمارش \ln شاخص بنیه بذر (Butola and Badola, 2004):
رابطه (۴)

$$\text{Vigor Index} = (LS + LR) \times GP$$

LS = طول ساقه، LR = طول ریشه، GP = درصد جوانه‌زنی
برای تهیه ۵۰ میلی‌لیتر بافر استخراج، ۰/۶۰۷ گرم تریس را با ۰/۰۵ گرم پلی‌وینیل پیرولیدون در ۴۰ میلی‌لیتر آب مقطر به‌خوبی حل کرده و سپس با اسید کلرید pH محلول را به ۸ رسانده و بعد از آن محلول را به حجم نهایی ۵۰ میلی‌لیتر می‌رسانیم و از این بافر برای عصاره‌گیری پروتئین‌های محلول و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی استفاده می‌کنیم (این محلول باید در یخچال نگهداری شود). جهت عصاره‌گیری، ابتدا ۰/۵ گرم نمونه برگ را در هاون چینی خرد می‌نماییم، سپس ۲ میلی‌لیتر بافر استخراج را به آن اضافه نموده می‌کوبیم. مخلوط حاصل را در لوله اپندورف و به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ نموده و پس از آن فاز بالایی جهت خواندن میزان پروتئین و فعالیت آنزیم‌ها جدا می‌گردد.

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). نمونه‌برداری‌ها برای انجام اندازه‌گیری‌های بیوشیمیایی در روز هشتم انجام گرفت (ISTA, 2005).
درصد نهایی جوانه‌زنی (Lopez-Moreno et al., 2010):
رابطه (۱)

$$\text{Germination Percentage (\%)} = \frac{n}{N} \times 100$$

n = تعداد بذره‌های جوانه‌زده، N = کل بذور
انرژی جوانه‌زنی (GE) عبارت است از درصد بذور جوانه‌زده در زمانیکه جوانه‌زنی به اوج خود می‌رسد (Ruan et al., 2002).
رابطه (۲)

$$\text{Germination Energy (\%)} = \frac{Ni}{N} \times 100$$

Ni = تعداد بذور جوانه‌زده در برخی ارقام روز دوم و در برخی روز چهارم (اوج جوانه‌زنی)، N = تعداد کل بذور
سرعت جوانه‌زنی (Maguire, 1962):
رابطه (۳)

دقیقه در اتاقک نور قرار داده شد. سپس میزان جذب نوری محلول حاصل در دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۶۰ nm خوانده شد (Beauchamp and Fridovich, 1971).

برای اندازه‌گیری محتوای پروتئین ۲۰ میکرولیتر عصاره استخراج شده را در ۸۰ میکرولیتر بافر استخراج رقیق و ۵ میلی‌لیتر معرف برادفورد به آن افزوده و سپس ورتکس شد و پس از گذشت ۵ دقیقه، میزان جذب نوری آن در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد (Bradford, 1976).

تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از آزمایش توسط نرم‌افزار SAS (9.2) 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

درصد نهایی جوانه‌زنی: نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که اثر غلظت اسید هیومیک، نانو ذره اکسید روی بر درصد نهایی جوانه‌زنی در سطح احتمال $P < 0.05$ معنی‌دار بود (جدول ۲). درصد نهایی جوانه‌زنی با مصرف اسید هیومیک به‌طور معنی‌داری بیشتر از شاهد بود (شکل ۲). همچنین بر پایه یافته‌های به‌دست آمده، با افزایش سطوح نانو ذرات اکسید روی، درصد نهایی جوانه‌زنی $1/45$ برابر نسبت به شاهد کاهش داشت (شکل ۳). همچنین نانو ذرات فلزی باعث بازدارندگی جوانه‌زنی در برنج شد (Da Costa and Sharma, 2016).

وجود نانو ذره در محیط جوانه‌زنی به‌دلیل نفوذ سریع به داخل بذر همراه آب از طریق تأثیر بر فرایندهای فیزیولوژیکی مهم از جمله تنفس و جلوگیری از تقسیم سلول‌ها سبب اختلال در جوانه‌زنی و رشد گیاهچه می‌شود (Marquez-Garcia et al., 2013).

سرعت جوانه‌زنی: نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که اثر اسید هیومیک، نانو ذره اکسیدروی و اثر متقابل آنها بر شاخص سرعت جوانه‌زنی در سطح احتمال $P < 0.05$ معنی‌دار بود (جدول ۲). سمیت نانو ذره اکسید روی با حضور اسید هیومیک کاهش یافت. در این رابطه کمترین میزان سرعت

برای اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز ۵۰ میکرولیتر از عصاره استخراج شده را با یک میلی‌لیتر محلول اندازه‌گیری آسکوربیک پراکسیداز مخلوط گردید. سپس جذب آن در طول موج ۲۹۰nm پس از مدت یک دقیقه با دستگاه اسپکتروفتومتر (Biotek Power Wave xs₂) خوانده شد (Nakano and Asada, 1981).

برای اندازه‌گیری میزان فعالیت کمی آنزیم پراکسیداز ۳۳ میکرولیتر از عصاره آنزیمی رقیق شده با یک میلی‌لیتر از سوبسترای پراکسیداز مخلوط و به مدت بیست دقیقه با فواصل ۳۰ ثانیه در طول موج ۴۷۰nm خوانده گردید (Chance and Maehly, 1955).

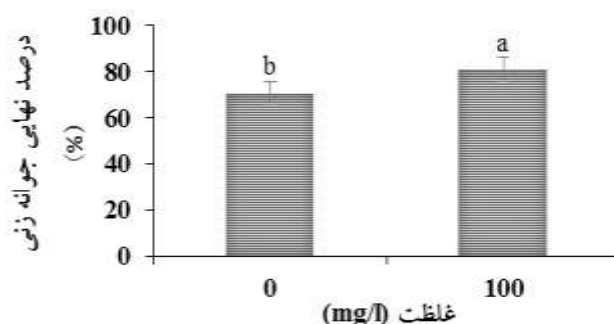
فعالیت آنزیم کاتالاز به‌روش زیر اندازه‌گیری شد: ۵۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی رقیق شده با ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار pH=۷ مخلوط و واکنش با اضافه کردن ۵۰۰ میکرولیتر محلول هیدروژن پراکسید ۶۰ میلی‌مولار آغاز گردید. پس از گذشت زمان معین با استفاده از ۲ میلی‌لیتر معرف دی‌کرومات (۰.۵٪)، استیک اسید (۳:۱) واکنش پایان یافت. لوله‌های آزمایش به‌سرعت داخل حمام آب جوش به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد. خواندن با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج جذبی ۵۷۰ نانومتر صورت گرفت (Sinha, 1972).

اندازه‌گیری میزان فعالیت کمی آنزیم سوپراکسید دیسموتاز: برای این منظور ابتدا ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره استخراج شده به کمک محلول استخراج به حجم نهایی ۲۰۰ میکرولیتر رسانده و به ۴ میلی‌لیتر محلول اندازه‌گیری سوپراکسید دیسموتاز که شامل ۵۰ میلی‌مول بافر فسفات پتاسیم با pH=۷، ۷۵ میکرومولار نیترو بلو تترازولیوم، ۱۳ میلی‌مولار ال- متیونین، ۰/۱ میلی‌مولار EDTA و ۲ میکرومولار ریبولوآوین بود، مخلوط گردید. سپس دو نمونه بدون عصاره حاوی ۲۰۰ میکرولیتر بافر استخراج را به‌عنوان کنترل و بلائک مورد استفاده قرار گرفت. پس از اضافه کردن عصاره استخراج و محلول اندازه‌گیری سوپراکسید دیسموتاز به کوت اضافه شد. جهت انجام واکنش این مخلوط به مدت ۱۵

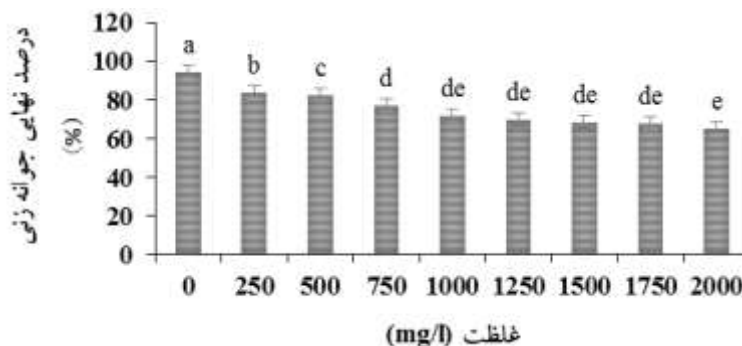
جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس برخی شاخص‌های جوانه‌زنی

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		درصد نهایی جوانه‌زنی	سرعت جوانه‌زنی	انرژی جوانه‌زنی
اسید هیومیک	۱	۱۴۵۱/۸۵ *	۲۱/۹۹ *	۱۷۱۱/۴۰ *
اکسید روی	۸	۵۵۶/۵۱*	۳/۱۵۶ *	۴۰۹/۳۳ *
اسید هیومیک × اکسید روی	۸	۱۵/۱۸ ^{ns}	۱/۳۷ *	۶/۰۷ ^{ns}
خطا	۳۶	۱۷/۴۸	۰/۱۱۵	۱۸/۰۷
ضریب تغییرات	-	۵/۵۱	۴/۲۸	۵/۸۶
شاخص بنیه بذر				۱۵۴۱۹۴۲۵۰ *
				۹۸۰۶۲۵۳۱/۶ *
				۱۰۸۲۷۰۳/۳ *
				۸۶۷۰۹/۵
				۶/۴۶

* و ns به ترتیب معنی‌داری و عدم معنی‌داری در سطح احتمال $P < 0.05$ را نشان می‌دهد.



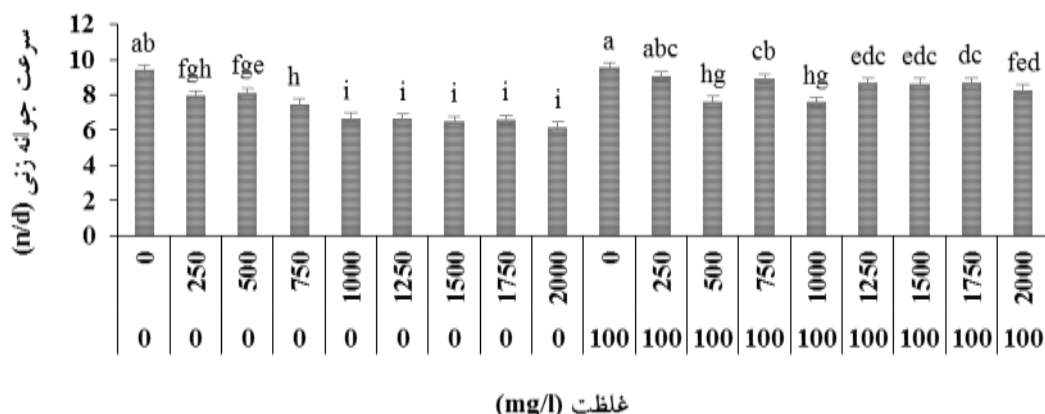
شکل ۲- مقایسه میانگین اثرات ساده اسید هیومیک (HA) بر شاخص درصد نهایی جوانه‌زنی (درصد). حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از آزمون LSD است.



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف اکسید روی (ZnO) بر شاخص درصد نهایی جوانه‌زنی (درصد). حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از آزمون LSD است.

روز) مشاهده شد (شکل ۴). مطالعات زیادی نشان داده است که اسید هیومیک بر شاخص‌های جوانه‌زنی و رشد گیاهان مختلف اثر مثبت داشته است از جمله کاربرد اسید هیومیک در گندم را باعث افزایش جذب آب، تنفس و میزان جوانه‌زنی و

جوانه‌زنی در سطح صفر اسید هیومیک و سطح ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانو ذره اکسید روی (۶/۱۹ تعداد در روز) و بیشترین میزان سرعت جوانه‌زنی در سطح ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید هیومیک و سطح صفر نانو ذره اکسید روی (۹/۵۶ تعداد در



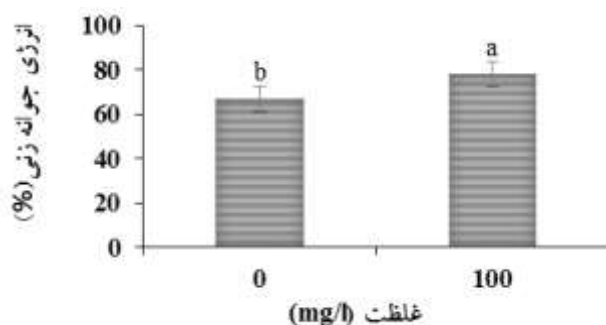
شکل ۴- مقایسه میانگین اثر متقابل اسید هیومیک و اکسید روی بر سرعت جوانه‌زنی. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از آزمون LSD است.

کاهش رشد گیاه، ساقه، ریشه، تأخیر در گل‌دهی و کاهش عملکرد گیاه می‌شوند (El-Temsah and Joner, 2012). نانو ذرات فلزی باعث بازدارندگی جوانه‌زنی در برنج شد (Da Costa and Sharma, 2016).

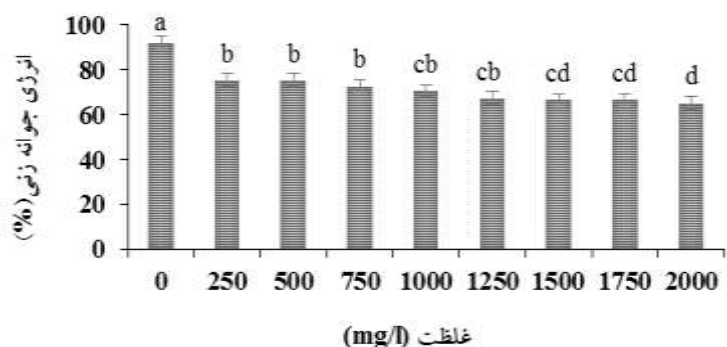
شاخص بنیه بذر: نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که اثر اسید هیومیک، نانو ذره اکسید روی و اثر متقابل آنها بر شاخص بنیه بذر در سطح احتمال $P < 0.05$ معنی‌دار بود (جدول ۲). یکی دیگر از شاخص‌های جوانه‌زنی که تحت سمیت نانو ذرات اکسید روی و اسید هیومیک قرار گرفت، شاخص بنیه بذر بود. بر همین اساس، کمترین میزان شاخص بنیه بذر هنگامی مشاهده شد که بالاترین غلظت‌های نانو ذره اکسید روی استفاده شده بود و حضور اسید هیومیک توانسته بود این اثر سمیت را به‌طور معنی‌داری کاهش دهد (شکل ۷). غلظت ۵۴ میلی‌گرم در لیتر اسید هیومیک باعث افزایش معنی‌دار شاخص بنیه بذر گندم شد (سبزواری و همکاران، ۱۳۸۹). استفاده از اسید هیومیک باعث افزایش طول ریشه‌چه و ساقه‌چه و در نهایت افزایش شاخص بنیه بذر در گیاهان شده است. افزایش طول ساقه و ریشه به خاطر تأثیر مثبت اسید هیومیک بر تنفس گیاهی، یعنی افزایش تولید ATP با تحریک فسفریلاسیون اکسیداتیو همراه با افزایش جذب و انتقال مواد مغذی و همچنین بیوسنتز ترکیبات است (Silva et al., 1999). در نتیجه شاخص بنیه بذر در تیمار اسید هیومیک

در نتیجه سرعت جوانه‌زنی دانستند (Kadam et al., 2011). غلظت ۵۴ میلی‌گرم در لیتر اسید هیومیک باعث افزایش سرعت جوانه‌زنی، طول و وزن خشک ریشه‌چه گندم شد (سبزواری و همکاران، ۱۳۸۹). اسید هیومیک باعث افزایش جذب آب و تنفس در هنگام جوانه‌زنی شده و در نتیجه سرعت جوانه‌زنی را افزایش می‌دهد (Saruhan et al., 2011).

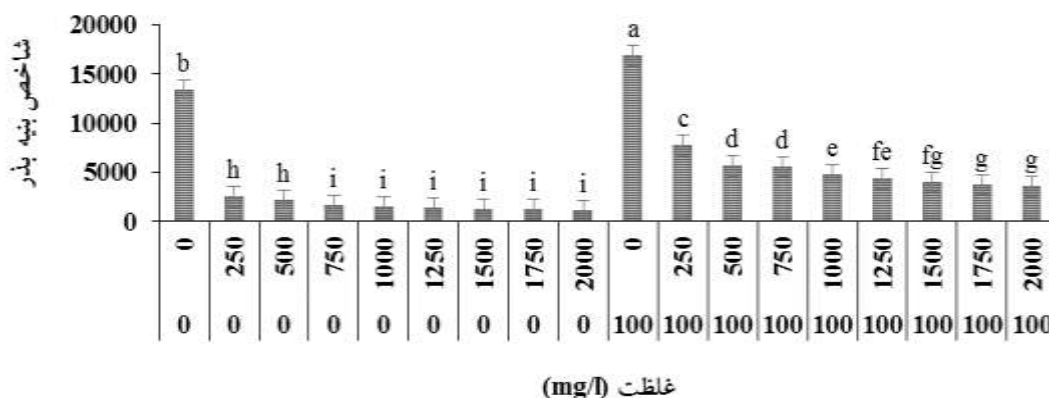
انرژی جوانه‌زنی: نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که اثر غلظت اسید هیومیک، نانو ذره اکسید روی بر انرژی جوانه‌زنی در سطح احتمال $P < 0.05$ معنی‌دار بود (جدول ۲). به‌کارگیری اسید هیومیک نیز افزایشی نزدیک به ۱/۲ برابر معنی‌داری در مقایسه با عدم مصرف آن در انرژی جوانه‌زنی گیاه ایجاد کرد (شکل ۵). با افزایش سطوح نانو ذره اکسید روی انرژی جوانه‌زنی به‌طور معنی‌داری کاهش یافت به‌طوری‌که میزان انرژی جوانه‌زنی نزدیک به ۱/۵ برابر نسبت به شاهد کاهش نشان داد (شکل ۶). کاهش مقدار انرژی جوانه‌زنی به دلیل کاهش درصد جوانه‌زنی است زیرا انرژی جوانه‌زنی تابعی از تعداد بذرهای جوانه‌زده است در نتیجه با کاهش تعداد بذرهای جوانه‌زده، انرژی جوانه‌زنی کاهش می‌یابد. نانو ذرات، با توجه به اندازه کوچک و واکنش‌پذیری بالایی که دارند می‌توانند وارد سلول شده و بر مکانیسم‌های مختلف درون سلول اثر گذاشته و باعث اختلال در تقسیم سلولی شوند. همچنین نانو ذرات باعث توقف جوانه‌زنی بذر،



شکل ۵- مقایسه میانگین اثرات ساده اسید هیومیک (HA) بر شاخص انرژی جوانه‌زنی (درصد). حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از آزمون LSD است.



شکل ۶- مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف اکسید روی (ZnO) بر شاخص انرژی جوانه‌زنی (درصد). حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از آزمون LSD است.



شکل ۷- مقایسه میانگین اثر متقابل اسید هیومیک و اکسید روی بر شاخص بینه بدر. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از آزمون LSD است.

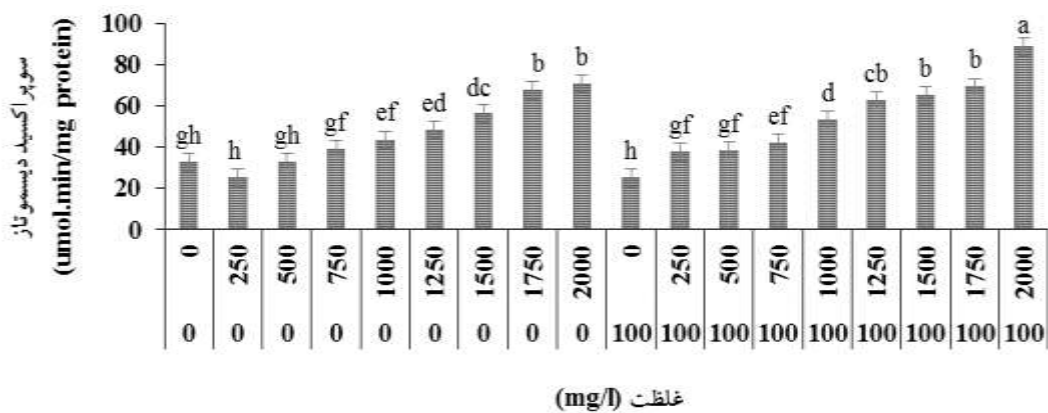
افزایش می‌یابد. افزایش نانو ذره اکسید روی بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز را تشدید کرد (شکل ۸). طی بررسی‌هایی گزارش کردند که اثر اسید هیومیک بر برنج باعث افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز می‌شود (Xie et al., 2015). می‌توان اظهار داشت که اسید هیومیک با افزایش ظرفیت نگه‌داری آب

سوپراکسید دیسموتاز: نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که اثر اسید هیومیک، نانو ذره اکسید روی و اثر متقابل آنها بر آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در سطح احتمال $P < 0.05$ معنی‌دار بود (جدول ۳). بر همین اساس اسید هیومیک اثرات

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس برخی فعالیت‌های بیوشیمیایی

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		کاتالاز	آسکوربات پراکسیداز	پراکسیداز	سوپراکسید دیسموتاز
اسید هیومیک	۱	۶۷۷۲۳/۵ *	۴۲۶/۵۳ *	۵۲۳۶۱/۶ *	۷۱۰/۴ *
اکسید روی	۸	۱۹۸۰۶۱/۵ *	۲۵۳/۵۸ *	۷۱۴۱۱/۱۳ *	۱۸۵۰/۶ *
اسید هیومیک × اکسید روی	۸	۱۱۰۰۶/۲ *	۶۷/۱۷ *	۹۸۷۲/۰۶ *	۸۸/۶۶ *
خطا	۳۶	۳۰۷۸/۸	۴/۶۴	۱۹۳۷/۹	۲۴/۰۱
ضریب تغییرات	-	۹/۲۹	۱۰/۵۵	۱۱/۷۵	۹/۸۳

* و ns به ترتیب معنی‌داری و عدم معنی‌داری در سطح احتمال $P < 0.05$ را نشان می‌دهد.



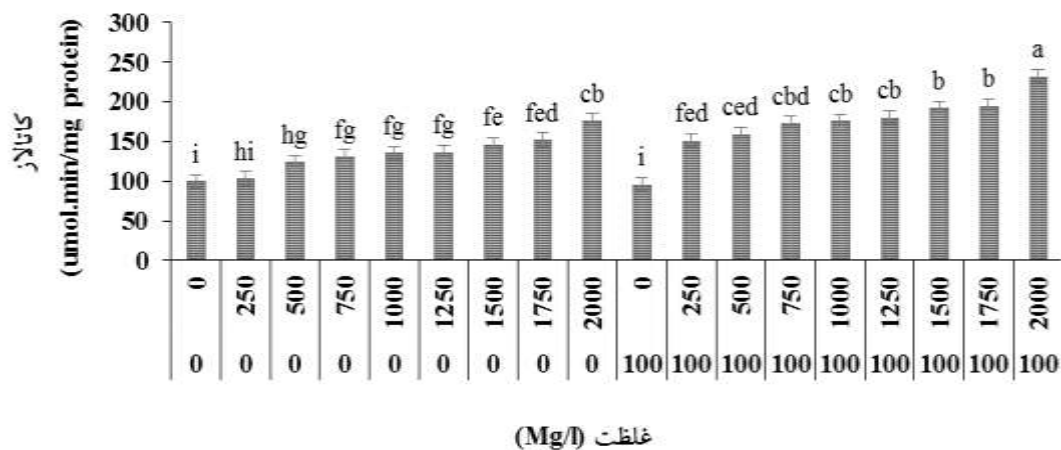
شکل ۸- مقایسه میانگین اثر متقابل اسید هیومیک و اسید روی بر میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از آزمون LSD است.

پروتئین) بود. همچنین بیشترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در سطح ۱۰۰ اسید هیومیک و سطح ۲۰۰۰ نانو ذره اسید روی (۲۳۲/۶ میکرومول در دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین) مشاهده شد (شکل ۹). طی یک بررسی نشان داده شد که اسید هیومیک باعث افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه زنجبیل می‌شود (Ghasemzadeh *et al.*, 2011). همچنین ورمی کمپوست تأثیر معنی‌داری بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنزیمی داشته است (آدمی‌پور و همکاران، ۱۳۹۵).

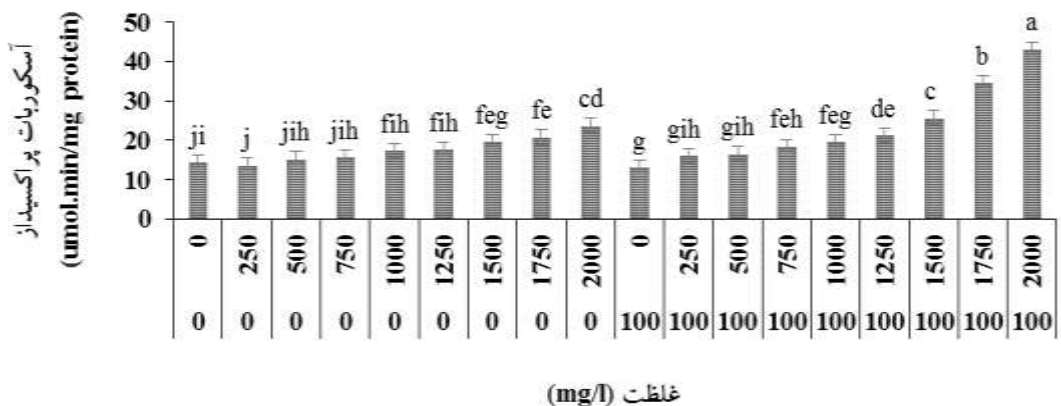
آسکوربات پراکسیداز: نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که اثر اسید هیومیک، نانو ذره اسید روی و اثر متقابل آنها بر آنزیم آسکوربات پراکسیداز در سطح احتمال $P < 0.05$ معنی‌دار بود (جدول ۳). بررسی میانگین ترکیب‌های مختلف اسید هیومیک و نانو ذره اسید روی، نشان داد که اسید

و از طریق فعالیت شبه هورمونی می‌تواند سبب افزایش فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدان گیاه گردد (Khan *et al.*, 2013). اسید هیومیک به دلیل 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).

کاتالاز: نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که اثر اسید هیومیک، نانو ذره اسید روی و اثر متقابل آنها بر آنزیم کاتالاز در سطح احتمال $P < 0.05$ معنی‌دار بود (جدول ۳). نتایج مقایسه میانگین نشان داد که کمترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در سطح ۱۰۰ میلی‌گرم اسید هیومیک در لیتر و سطح صفر نانو ذره اسید روی (۹۶/۰۲ میکرومول در دقیقه بر میلی‌گرم



شکل ۹- مقایسه میانگین اثر متقابل اسید هیومیک و اکسید روی بر میزان فعالیت کاتالاز. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از آزمون LSD است.

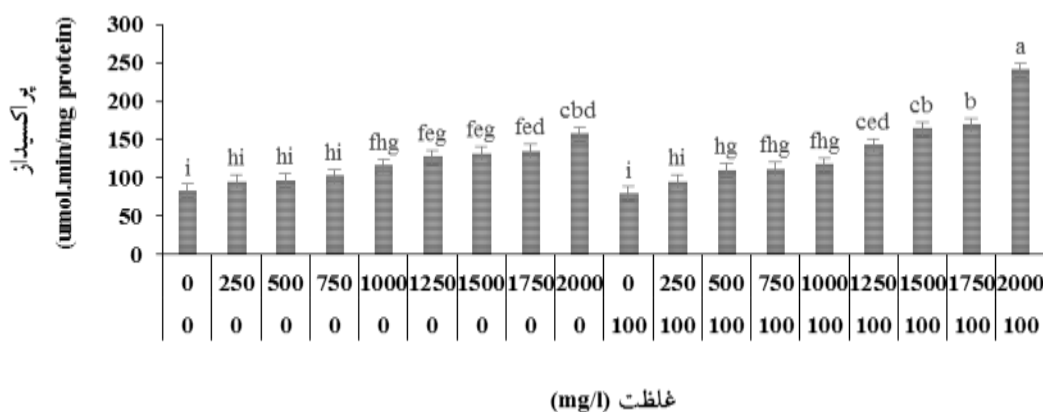


شکل ۱۰- مقایسه میانگین اثر متقابل اسید هیومیک و اکسید روی بر میزان فعالیت آسکوربات پراکسیداز. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از آزمون LSD است.

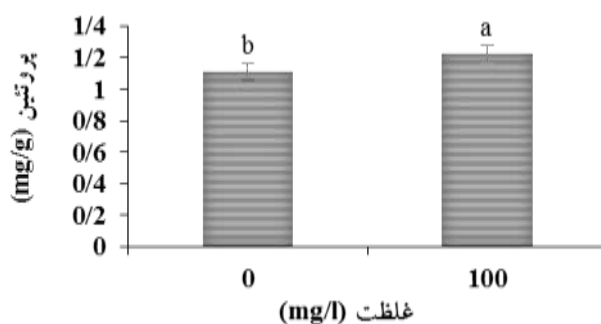
از طریق حفظ نفوذپذیری غشا و افزایش متابولیسم سلولی، رشد گیاهان را در شرایط متفاوت محیطی افزایش می‌دهد را برای اسید هیومیک تأیید کرده‌اند (Cooper et al., 1998).

پراکسیداز: نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که اثر اسید هیومیک، نانو ذره اکسید روی و اثر متقابل آنها بر آنزیم پراکسیداز در سطح احتمال $P < 0.05$ معنی‌دار بود (جدول ۳). در این رابطه فعالیت آنزیم پراکسیداز هنگام افزودن اسید هیومیک به پتری‌دیش‌های حاوی نانو ذرات اکسید روی ۱/۵ برابر افزایش یافت (شکل ۱۱). اسید هیومیک در اثر متقابل با کادمیوم برای از بین بردن هیدروژن پراکسید سمی فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز را افزایش داد (Ozfidan-

هیومیک و نانو ذره اکسید روی اثر هم‌افزایی معنی‌داری بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز داشتند (از ۱۳/۲۱ به ۴۳/۲۳ میکرومول در دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین به ترتیب برای ترکیب‌های نانو ذره روی تنها و نانو ذره همراه با اسید هیومیک) (شکل ۱۰). اسید هیومیک با افزایش فعالیت شبه هورمونی می‌تواند سبب افزایش فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدان گیاه گردد (Zhang and Schmidt, 2000). همچنین در همین راستا افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در پی استفاده از اسید هیومیک در انگور مشاهده شده است (Kesba and El-Beltagi, 2012). برخی از گزارش‌ها نیز فعالیت‌های شبه هورمونی از جمله تأثیری همانند اکسین، جیبرلین و سیتوکینین



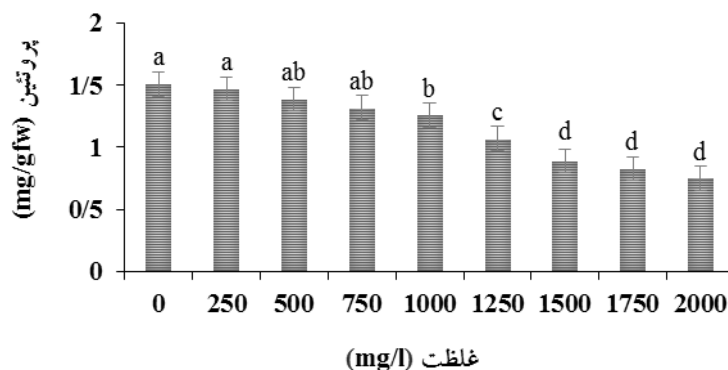
شکل ۱۱- مقایسه میانگین اثر متقابل اسید هیومیک و اکسید روی بر میزان فعالیت پراکسیداز. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از آزمون LSD است.



شکل ۱۲- مقایسه میانگین اثرات ساده غلظت اسید هیومیک بر محتوای پروتئین (mg/gfw). حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از آزمون LSD است.

آنتی‌اکسیدانی گیاهان تأثیر مفید دارد (Salimon *et al.*, 2012). پروتئین: نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که اثر غلظت اسید هیومیک، نانو ذره اکسید روی بر محتوای پروتئین در سطح احتمال $P < 0.05$ معنی‌دار بود (جدول ۳). به کارگیری اسید هیومیک افزایش معنی‌داری در مقایسه با عدم مصرف آن در محتوای پروتئین گیاه ایجاد کرد (شکل ۱۲). در این رابطه، افزایش غلظت نانو ذرات اکسید روی محتوای پروتئین را نزدیک به دو برابر کاهش داد (از $1/51$ به 0.75 میلی‌گرم بر گرم برگ تازه) (شکل ۱۳). کاهش در محتوای پروتئین محلول برگ تحت سمیت اکسید روی در گیاه یونجه گزارش شده است (Bandyopadhyay *et al.*, 2015). گونه‌های فعال اکسیژن می‌توانند با صدمه زدن به پروتئوم گیاه باعث نابودی شمار زیادی از پروتئین‌های گیاه شوند (Turgut *et al.*, 2004).

(Konakci *et al.*, 2018). میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی میوه فلفل تحت تأثیر تیمارهای ورمی‌کمپوست افزایش یافت (Aminifard *et al.*, 2012). می‌توان اظهار داشت که اسید هیومیک از طریق فعالیت شبه هورمونی می‌تواند سبب افزایش فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدان گیاه گردد (Khan *et al.*, 2013). مهم‌ترین سازوکارهای اسید هیومیک تولید ایندول استیک اسید، سیتوکینین‌ها 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 نیتريت حاصل از تنفس نیتراتی با اسید آسکوربیک است بنابراین این ترکیب علاوه بر تأثیر مستقیم با سازوکار تولید مواد تنظیم‌کننده رشد گیاه به‌طور غیرمستقیم با کنترل میزان فعالیت آنزیم‌های



شکل ۱۳- مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف اکسید روی (ZnO) بر محتوای پروتئین (mg/g fw). حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از آزمون LSD است.

اسید هیومیک باعث افزایش بیشتر در میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاه شد و با محافظت گیاه در برابر سمیت نانو ذره اکسید روی، باعث کاهش خسارت‌های ناشی از تنش اکسیداتیو آن گردید. همچنین می‌توان اظهار داشت که اسید هیومیک با افزایش فعالیت شبه هورمونی می‌تواند سبب افزایش فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدان گیاه گردد و اثرات سمیت نانو ذره را کاهش دهد و در نتیجه سرعت جوانه‌زنی و شاخص بینه بذرها را افزایش دهد.

همچنین فلزات با اختلال در فرایند تثبیت نیتروژن از طریق بازدارندگی فعالیت آنزیم‌هایی مانند گلوتامین سینتاز، گلوتامات سینتاز و نیترات ردوکتاز و فرایند احیا نیترات سبب کاهش تولید پروتئین شده و رشد را متوقف می‌کند (Panda and Khan, 2003).

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به‌دست آمده از این مطالعه می‌توان اظهار داشت که با افزایش شدت سمیت نانو ذره اکسید روی میزان فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدان‌ها افزایش می‌یابد. با این حال تیمار با

منابع

- آدمی‌پور، ن.، حیدریان‌پور، م. ب. و زارعی، م. (۱۳۹۵) ارزیابی کاربرد رومی‌کمپوست جهت کاهش اثرهای مخرب تنش شوری بر سبزه‌فرش چماناوش بلند (*Festuca arundinacea schreb queen*). علوم و فنون کشت‌های گلخانه‌ای ۷: ۳۵-۴۶.
- سبزواری، س.، خزایی، ح. و کافی، م. (۱۳۸۹) مطالعه اثر اسید هیومیک بر جوانه‌زنی چهار رقم گندم پاییزه (سایونز و سبلان) و بهاره (چمران و پیشناز). نشریه پژوهش‌های زراعی ایران ۱: ۴۲۳-۴۱۱.
- 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: 815-823.
- Aminifard, M. H., Aroiee, H., Azizi, M., Nemati, H. and Jaafar, H. Z. (2012) The influence of compost on antioxidant activities and quality of hot pepper (*Capsicum annum L.*). *Caspian Journal of Applied Sciences Research* 1: 80-86.
- 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.
- Butola, J. S. and Badola, H. K. (2004) Effect of pre-sowing treatment on seed germination and seedling vigour in *Angelica glauca*, a threatened medicinal herb. *Current Science* 796-799.
- 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.
- 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.
- Dietz, K. J. and Herth, S. (2011) Plant nanotoxicology. *Trends in Plant Science* 16: 582-589.
- El-Temseh, Y. S. and Joner, E. J. (2012) Impact of Fe and Ag nanoparticles on seed germination and differences in bioavailability during exposure in aqueous suspension and soil. *Environmental Toxicology* 27: 42-49.
- Endalew, A. K., Kiros, Y. and Zanzi, R. (2011) Heterogeneous catalysis for biodiesel production from *Jatropha curcas* oil (JCO). *Energy* 36: 2693-2700.
- Ghasemzadeh, A., Jaafar, H. Z. and Rahmat, A. (2011) Effects of solvent type on phenolics and flavonoids content and antioxidant activities in two varieties of young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) extracts. *Journal of Medicinal Plants Research* 5: 1147-1154.
- Hernandez-Viezcas, J., Castillo-Michel, H., Servin, A., Peralta-Videa, J. and Gardea-Torresdey, J. (2011) Spectroscopic verification of zinc absorption and distribution in the desert plant *Prosopis juliflora-velutina* (velvet mesquite) treated with ZnO nanoparticles. *Chemical Engineering Journal* 170: 346-352.
- ISTA. (2005) International rules for seed testing. International Seed Testing Association.
- Kadam, A., Wadje, S. and PATIL, R. (2011) Role of potassium humate on growth and yield of soybean and black gram. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 1: 243-246.
- Kesba, H. H. and El-Beltagi, H. S. (2012) Biochemical changes in grape rootstocks resulted from humic acid treatments in relation to nematode infection. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2: 287-293.
- Khan, A., Khan, M., Hussain, F., Akhtar, M., Gurmani, A. and Khan, S. (2013) Effect of humic acid on the growth, yield, nutrient composition, photosynthetic pigment and total sugar contents of peas (*Pisum sativum* L.). *Journal of the Chemical Society of Pakistan* 35: 206-211.
- Lopez-Moreno, M. L., de la Rosa, G., Hernandez-Viezcas, J. A., Castillo-Michel, H., Botez, C. E., Peralta-Videa, J. R. and Gardea-Torresdey, J. L. (2010) Evidence of the differential biotransformation and genotoxicity of ZnO and CeO₂ nanoparticles on soybean (*Glycine max*) plants. *Environmental Science and Technology* 44: 7315-7320.
- Ma, X., Geiser-Lee, J., Deng, Y. and Kolmakov, A. (2010) Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: phytotoxicity, uptake and accumulation. *Science of The Total Environment* 408: 3053-3061.
- Maguire, J. D. (1962) Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science* 2: 176-177.
- Marquez-Garcia, B., Marquez, C., Sanjose, I., Nieva, F., Rodriguez-Rubio, P. and Munoz-Rodriguez, A. (2013) The effects of heavy metals on germination and seedling characteristics in two halophyte species in Mediterranean marshes. *Marine Pollution Bulletin* 70: 119-124.
- Nakano, Y. and Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* 22: 867-880.
- Ozfidan-Konakci, C., Yildiztugay, E., Bahtiyar, M. and Kucukoduk, M. (2018) The humic acid-induced changes in the water status, chlorophyll fluorescence and antioxidant defense systems of wheat leaves with cadmium stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 155: 66-75.
- Panda, S. and Khan, M. (2003) Antioxidant efficiency in rice (*Oryza sativa* L.) leaves under heavy metal toxicity. *Journal of Plant Biology-New Delhi* 30: 23-30.
- 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.
- Pokhrel, L. R. and Dubey, B. (2013) Evaluation of developmental responses of two crop plants exposed to silver and zinc oxide nanoparticles. *Science of The Total Environment* 452: 321-332.
- Ruan, S., Xue, Q. and Tylkowska, K. (2002) The influence of priming on germination of rice (*Oryza sativa* L.) seeds and seedling emergence and performance in flooded soil. *Seed Science and Technology* 30: 61-67.
- Salimon, J., Salih, N. and Yousif, E. (2012) Biolubricant basestocks from chemically modified ricinoleic acid. *Journal of King Saud University-Science* 24: 11-17.
- Saruhan, V., Kusvuran, A. and Kokten, K. (2011) The effect of different replications of humic acid fertilization on yield performances of common vetch (*Vicia sativa* L.). *African Journal of Biotechnology* 10: 5587-5592.
- Schwabe, F., Schulin, R., Limbach, L. K., Stark, W., Burge, D. and Nowack, B. (2013) Influence of two types of organic matter on interaction of CeO₂ nanoparticles with plants in hydroponic culture. *Chemosphere* 91: 512-520.
- Silva, R. d., Jablonski, A., Siewerdt, L. and Silveira Junior, P. (1999) Crescimento da parte aérea e do sistema radicular do milho cultivado em solucao nutritiva adicionada de substancias humicas. *Revista Brasileira de Agrociencia* 5: 101-110.
- Sinha, A. K. (1972) Colorimetric assay of catalase. *Analytical Biochemistry* 47: 389-394.
- Stoimenov, P. K., Klinger, R. L., Marchin, G. L. and Klabunde, K. J. (2002) Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents. *Langmuir* 18: 6679-6686.

- 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.
- 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.
- 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, X. and Schmidt, R. (2000) Hormone-containing products' impact on antioxidant status of tall fescue and creeping bentgrass subjected to drought. *Crop Science* 40: 1344-1349.

Interaction of ZnO Nanoparticle with Humic acid on Germination of Rapeseed (*Brassica napus* L.)

Afsaneh Yarmohammadi, Mahmoud Khorami vafa *, Saeid Jalali Honarmand

Department of Production and Plant Genetics, Faculty of Agriculture, Razi University
(Received: 12/05/2018, Accepted: 27/10/2018)

Abstract

Humic acid can vary the toxicity of biotoxins at different environments when it is bond to them. Therefore, the interaction between nanoparticles and humic acid is specially considered in the view of environmental point . The objectives of this study were the investigation of ZnO nanoparticle toxicity on rapeseed at germination stage, and the reduction of the nanoparticle toxicity by humic acid in laboratory condition. The experiment was conducted with nine concentrations of 0, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750, 2000 mg / L zinc oxide nanoparticle and two concentrations of 0, 100 mg / L humic acid, as factorial in a completely randomized design with three replications. The results showed that increasing of the ZnO nanoparticle concentration caused increasing the activity of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, catalase and peroxidase enzymes, while the protein content showed a reduction trend. Humic acid application decreased the toxicity effects of ZnO nanoparticle. Increasing the concentration of ZnO nanoparticle caused reduction in germination indices (such as final germination percentage, germination energy, germination rate and seed vigor index). However, application of humic acid resulted in improving the germination indices, antioxidants activity in the plant and a reduction of toxicity by protecting the plant against the ZnO nanoparticle.

Keywords: Biochemical activity; Environmental pollution; Germination indices; Natural organic matter; Oilseed crops

Corresponding author, Email: Khoramivafa@razi.ac.ir