



<https://ijpb.ui.ac.ir/?lang=en>
Journal of Plant Biological Sciences
E-ISSN: 3041-9603
Vol. 15, Issue. 3, No. 57, Autumn 2023
Document Type: Research Paper
Received: 11/07/2023 Accepted: 04/08/2024

Dose-dependent effect of CuO nanoparticles on water deficit-induced osmotic and oxidative stresses in fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.)

Rayhaneh Amooaghaie^{1,2*} , Ameneh Naderi¹, Sadegh Farhadian¹

¹ Plant Science Department, Faculty of Science, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

² Biotechnology Research Institute, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

Abstract

Regarding to water deficit issue in our country, it is essential to find innovative methods to alleviate the adverse effects of drought stress on plants. Therefore, a pot experiment was conducted to evaluate the effect of 3 levels of irrigation intervals (1, 2, 3 days) and 5 levels of CuO NPs (0, 2.5, 5, 10, 20 mg/L) on fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). Results showed that increasing irrigation intervals reduced fresh and dry weights of plants, total chlorophyll and carotenoid contents, and relative water content (RWC) and increased lipid peroxidation, proline content, and the activities of ascorbate peroxidase (APX) and catalase (CAT) enzymes. The foliar application of CuO NPs influenced all the above-mentioned parameters in a dose-dependent manner. Foliar application of CuO NPs till 10 mg/L improved plant growth, the content of photosynthetic pigments, RWC, and proline accumulation, and reduced lipid peroxidation level through up-regulation of antioxidant enzymes. In contrast, 20 mg/L CuO NPs, decreased growth parameters and chlorophyll content and significantly increased lipid peroxidation under both normal and drought stress conditions, which suggests the high dose of CuO NPs induced stressful situations for the plants. Therefore, low concentrations of CuO NPs moderated water deficit-induced osmotic and oxidative stresses but, the application of high concentrations of CuO NPs was not recommended for fennel cultivation.

Introduction

Drought stress negatively affects plant growth due to inducing cell osmotic and oxidative stresses. To cope with drought stress, plants activate enzymes and non-enzymatic antioxidants such as proline (Seleiman et al. 2021).

In recent decades, nanobiotechnology has received considerable attention due to its potential to boost growth and development and enhance plant stress tolerance (Zhao et al. 2020). Among different nanoparticles, CuO NPs are extensively used in agriculture, as pesticides, herbicides, fertilizers, and growth regulators (Xiong et al., 2017). Several

* Corresponding Author: rayhanehamooaghaie@yahoo.com



studies showed that Cu NPs effectively attenuated drought effects in plants by increasing antioxidant enzyme activities and RWC, reducing MDA accumulation, and stabilizing photosynthetic pigment content in leaves (Rahmani et al., 2016; Farooq et al., 2022). To our knowledge, very meager literature is available about the impact of NPs on fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) under water stress. Therefore, this context was evaluated in the present study.

Materials and Methods

This experiment was carried out as factorial based on a randomized complete design with three replications. The treatments included 3 levels of irrigation intervals (1, 2, 3 days) and 5 levels CuO NPs (0, 2.5, 5, 10, 20 mg/L). Seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) were sown in pots filled with soil and were normally irrigated for one month. Then, pots were divided into 3 sets, and irrigation began with intervals of 1, 2, and 3 days per each group. Simultaneously, foliar application with different levels CuO NPs was performed on 30-day-old plants. It is worth noting that NPs with purity > 99% and size of 40 nm, purchased from Research US Nanomaterials Inc., suspended in distilled deionized water, were sonicated at 100W and 80-90 kHz for 30 min and immediately used for foliar spray on plants. After 10 days, fresh leaf samples were collected and stored at -80 C to assess biochemical attributes. Then, plants were harvested and after measuring fresh weights, plants were dried at 70 C, to determine dry weight. Total chlorophyll and carotenoid contents (Lichtenthaler & Wellburn 1983), lipid peroxidation (Heath and Packer, 1968), proline content (Bates et al., 1973), RWC and the activities of APX and CAT enzymes (Amooaghaie, et al., 2022) was measured in all treatments.

Results and Discussion

Results indicate that CuO NPs increased the growth over their respective controls under 3 levels of irrigation. Among the different concentrations of CuO NPs, 10 mg/L had the most effect on increasing the chlorophyll and carotenoid contents, RWC, and plant growth. In addition, foliar application of CuO NPs reduced MDA content through enhancing antioxidant enzymes activity and proline accumulation in fennel. Our result is also similar to that of (Costa and Sharma (2016), who reported application of CuO NPs reduced oxidative stress in *Oryza sativa* through upregulating *APX* and *SOD* genes and consequently protected plants from drought stress. The impact of CuO NPs on plants might be due to the release of Cu from these NPs (Xiong et al., 2017). Copper (Cu) is known as an essential micronutrient, which functions in regulating plant growth, chlorophyll formation, photosynthesis, respiration, metabolism of carbohydrates and proteins, and defensive responses (Adrees et al., 2015).

However, the foliar application of 20 mg/L CuO NPs led to a significant decrease in growth parameters, total chlorophyll content, and RWC, and significantly increased lipid peroxidation under both normal and drought stress conditions (Mosapour Yahyaabadi & Asgharipour 2016), that suggests high dose of CuO NPs induced stressful situation for the plants. Other studies also showed that high doses of NPs decreased plant growth (shoot and root length) and increased the generation of reactive oxygen species (ROS) and lipid peroxidation (Nair & Chung 2015). Faraz et al. (2022) reported that among different concentrations of CuO NPs (0, 2, 4, 8, and 16 mg/L), 8 mg/L proved to be the optimum foliar spray treatment and increase the chlorophyll content, net photosynthetic rate, leaf proline content, and antioxidant enzymes activity,


but with increasing concentration of CuO NPs to 16 mg/L growth parameters were reduced in mustard.

Conclusions

Collectively, our results indicated that CuO NPs mediated responses were concentration-dependent. Foliar application of lower doses of CuO NPs could attenuate water deficit-induced osmotic and oxidative stresses and increase drought tolerance in fennel, but the application of high concentrations of nano-CuO was not recommended for fennel cultivation. However, studies at the field level using different conditions and soil types are needed to confirm this recommendation.

Keywords: Antioxidant enzymes, Chlorophyll, Copper oxide nanoparticles, Drought stress, Fennel, Proline, Relative water content.

تأثیر وابسته به غلظت نانوذرات اکسید مس بر تنش اسمزی و تنش اکسیداتیو ناشی از کم آبی در رازیانه (*Foeniculum vulgare* Mill.)

ریحانه عموآقایی^{۱*} ، آمنه نادری^۱، صادق فرهادیان^۱
^۱ گروه زیست گیاهی، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
^۲ مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

چکیده

با توجه به مشکل کم آبی در کشور، یافتن شیوه‌های نوین برای غلبه بر آثار نامطلوب تنش خشکی بر گیاهان ضروری است. بنابراین در پژوهش حاضر، آزمایشی گلدانی برای ارزیابی تأثیر فواصل آبیاری در سه سطح (فواصل آبیاری ۱، ۲ و ۳ روزه) و پنج سطح نانوذرات اکسید مس (۰، ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر) بر روی گیاه رازیانه در گلخانه انجام شد. نتایج نشان داد با افزایش فواصل آبیاری، وزن تر و خشک گیاه، محتوای کلروفیل کل و کاروتنوئیدها و محتوای نسبی آب کاهش و پراکسیداسیون لیپیدی، میزان پرولین و فعالیت آنزیم‌های آنتی-اکسیدانی کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز افزایش یافت. محلول‌پاشی برگی با نانوذرات اکسید مس، همه صفات فوق را در یک الگوی وابسته به غلظت تحت تأثیر قرار داد. محلول‌پاشی برگی با نانوذرات اکسید مس تا غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر، سبب بهبود رشد گیاه، محتوای رنگدانه‌های فتوسنتزی، محتوای نسبی آب و تجمع پرولین شد و سطح پراکسیداسیون لیپیدی را با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، کاهش داد. در مقابل غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات اکسید مس سبب کاهش رشد، محتوای رنگدانه‌های فتوسنتزی و محتوای نسبی آب شد و بطور معنی‌داری پراکسیداسیون لیپیدی را هم در شرایط تنش و هم در شرایط نرمال افزایش داد که این نشان دهنده آن است که غلظت بالای نانو-ذرات اکسید مس خود برای گیاهان تنش‌زا بوده است. بنابر این غلظت کم نانوذرات اکسید مس تنش اسمزی و اکسیداتیو ناشی از تنش کم-آبی را تعدیل کرد، اما کاربرد غلظت زیاد نانوذرات اکسید مس در کشت رازیانه توصیه نمی‌شود.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، تنش خشکی، پرولین، رازیانه، کلروفیل، محتوای نسبی آب، نانوذرات اکسید مس.

* نگارنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: rayhanehamooaghaie@yahoo.com، شماره تماس: ۰۹۱۳۳۰۲۹۲۹۰



مقدمه

خشکی یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیر زیستی است که گیاهان بطور وسیع با آن روبرو می‌شوند. خشکی با ایجاد تنش اسمزی بر ریخت‌شناسی و فیزیولوژی گیاه تأثیر دارد و سبب کاهش رشد گیاه می‌شود (Osakabe et al., 2014). علاوه بر این، در طی تنش خشکی با بسته شدن روزنه، کاهش تثبیت دی‌اکسید کربن و پدیده بازدارندگی نوری رخ می‌دهد که در نتیجه گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) تولید و سبب ایجاد تنش اکسیداتیو و تخریب پروتئین‌ها، لیپیدها و دیگر اجزاء سلولی می‌شوند (Seleiman et al., 2021). گیاهان برای مقابله با این اثرات تنش خشکی چندین سازوکار حفاظتی را فعال می‌کنند که از آن جمله می‌توان به تجمع اسمولیت‌هایی مثل پرولین و قندهای محلول برای تنظیم وضعیت اسمزی سلول و فعال‌سازی آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی برای غلبه بر تنش اکسیداتیو ناشی از خشکی اشاره کرد (Zlatev & Lidon, 2012).

تاکنون روش‌های بسیاری از جمله اصلاح نباتات و مهندسی ژنتیک یا تیمار توسط هورمون‌ها و ترکیبات مختلف برای افزایش تحمل خشکی در گیاهان استفاده شده است. اما کاربرد نانوذرات در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است (Seleiman et al., 2021). نتایج یک پژوهش نشان داد محلول پاشی با غلظت مناسب نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم میزان اسانس، محتوای پرولین و فنل‌ها و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاهان رازیانه تحت تنش شوری را افزایش می‌دهد (Ahmed et al., 2024). کاربرد نانوذرات سیلیکون

روی گشسینز (Afshari et al., 2023) و نانو کود آهن روی شوید (Gholinezhad, 2017)، تحمل به خشکی و محصول این گیاهان را بهبود داد. تیمار با نانوذرات سیلیکون و نانو اکسید آهن سبب افزایش محتوای نسبی آب و تقویت فتوسنتز و در نتیجه تقویت تحمل خشکی در گیاه تربیتکاله شد (Aghaie et al., 2022). همچنین کاربرد نانوذرات مس و اکسید مس تحمل خشکی در کلزا و گندم را افزایش داد (Rahmani et al., 2016; Farooq et al., 2022). اگر چه اغلب منابع استفاده از نانوذرات را به عنوان یک شیوه نوین و ساده برای بهبود رشد و افزایش تحمل گیاهان در برابر تنش‌های غیر زیستی معرفی می‌کنند، اما باید توجه داشت که آثار نانوذرات روی گیاهان به بسیاری از عوامل از جمله ترکیب شیمیایی و خواص فیزیکوشیمیایی نانوذرات (مثل ماهیت و ترکیب شیمیایی، اندازه و شکل ذرات، آگلومریزاسیون و حالت چسبندگی، ساختار کریستالی، سطح و بار و مدت زمان پایداری و میزان حلالیت ذرات) بستگی دارد. از سوی دیگر ژنوتیپ و گونه گیاهی، مدت و شیوه در معرض قرارگیری با نانوذرات (در محیط جامد یا محلول) و غلظت نانوذرات، نیز در اثرات منفی یا مثبت نانوذرات بر گیاهان تأثیر دارد (Amooaghaie, et al., 2017; Amooaghaie, et al., 2018; Amooaghaie et al., 2021; Zhao et al., 2020).

یکی از نانوذرات پر کاربرد در حوزه کشاورزی و صنعت، نانوذرات اکسید مس است که برای مدیریت تغذیه گیاه و یا برای کنترل آفات و بیماری‌ها استفاده می‌شود (Xiong et al., 2017). بسیاری از آثار آن بر گیاهان مشابه تأثیر مس بر

پراکسید هیدروژن و آنیون سوپراکسید و افزایش نشت الکترولیت و پراکسیداسیون لیپیدی و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در برگ و لیگنینی شدن ریشه در این گیاهان شد (Singh et al., 2017). گزارش‌هایی هم مبنی بر اثرات نانوذرات حاوی مس روی پاسخ‌های گیاهان نسبت به تنش وجود دارد. برای مثال، تیمار با نانوذرات مس، آهن، کبالت و اکسید روی با افزایش بیان بسیاری از ژن‌های مرتبط با تحمل خشکی مانند دهیدرین‌ها، در ریشه‌ها و بخش هوایی گیاه سویا تحمل خشکی در این گیاه را تقویت کرد (Linh et al., 2020).

پژوهش دیگری نشان داد پرایم کردن دانه‌ها با نانوذرات اکسید مس منجر به افزایش محتوای نسبی آب، بیوماس، محتوای آنتوسیانین، کلروفیل، و کاروتنوئید و تحمل بیشتر تنش خشکی در گیاهچه ذرت شد (Nguyen et al., 2022). تأثیر وابسته به غلظت برای نانوذرات روی و اکسید روی در گوجه فرنگی و گندم تحت شرایط بدون تنش (Amooaghaie, et al., 2017) و برای نانوذرات دی اکسید تیتانیوم در زنیان تحت تنش شوری (Amooaghaie, et al., 2022) نیز گزارش شده است. بطور کلی غلظت‌های زیاد نانوذرات مس ممکن است سبب کاهش رشد و نیز بی‌نظمی در ردوکس سلولی و در سیستم دفاعی گیاه شود. یک پژوهش نشان داد افزایش غلظت نانوذرات اکسید مس منجر به افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و افزایش اکسیداسیون گلوکاتایون و فعالیت بیشتر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان آسکوربات پراکسیداز و گلوکاتایون ردوکتاز، اما تضعیف فعالیت سایر آنزیم‌های چرخه آسکوربات-گلوکاتایون در جو شد

فعالیت‌های فیزیولوژیکی گیاه است (Rajput et al., 2018). مس عنصری کم‌مصرف، اما ضروری برای همه گیاهان عالی است. نقش مهم مس به عنوان عنصر غذایی به علت شرکت آن در ساختمان آنزیم‌های مهم و مشارکت در نقل و انتقال الکترون و واکنش‌های اکسیداسیون - احیا است. پروتئین‌های حاوی مس نقش مهمی در فرآیندهایی از قبیل فتوسنتز، تنفس و ساخت لیگنین ایفاء می‌کنند. به هر حال، مقادیر زیاد آن به عنوان یک فلز سنگین اثر منفی بر رشد و نمو گیاهان دارد (Adrees et al., 2015).

بررسی منابع نشان دادند در بیشتر پژوهش‌ها، کاربرد غلظت‌های کم نانوذرات حاوی مس جوانه‌زنی دانه و رشد گیاهان را افزایش داد، اما در غلظت‌های بالاتر آثار سمّیت در سطح ریخت‌شناسی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مشاهده شد (Costa & Sharma, 2016; Mustafa et al., 2017; Xiong et al., 2017). برای مثال محلول-پاشی نانوذرات مس با غلظت ۲۰ پی‌پی‌ام منجر به افزایش طول ریشه و بخش هوایی گیاهچه ذرت شد، اما کاربرد غلظت‌های ۴۰ و ۶۰ پی‌پی‌ام منجر به کاهش رشد و محتوای پروتئین شد و عوارض سمّیت ایجاد کرد (Thiruvengadam et al., 2021). در پژوهش دیگری هم تأثیر نانوذرات اکسید مس بر گیاهان *Brassica oleracea* و *Solanum lycopersicum* وابسته به غلظت بود. بطوری که غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر، منجر به افزایش محتوای کلروفیل و قندها شد، اما غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات این صفات را کاهش دادند و موجب تجمع

آرایشی و بهداشتی کشت داده می‌شود (Badgujar et al., 2014). با توجه به وسعت مناطق خشک و نیمه خشک در جهان و ایران و با در نظر گرفتن گزارش‌های فوق درباره اثرات مثبت و منفی نانوذرات اکسید مس بر گیاهان، در پژوهش حاضر، تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید مس بر رشد و مدیریت تنش اسمزی و اکسیداتیو ناشی از کم‌آبی در رازیانه بررسی شد.

مواد و روش‌ها

کاشت گیاه و اعمال تیمارها

آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با ۳ تکرار به صورت گلدانی و در گلخانه دانشگاه شهرکرد انجام شد. ابتدا بذر رازیانه از شرکت پاکان بذر خریداری شد و پس از ضدعفونی سطحی، در گلدان‌های پر شده با مخلوط کود و خاک کاشته و آبیاری با آب معمولی با فاصله یک روزه شروع شد. بعد از یک ماه از اجرای این رژیم آبیاری و رشد کردن گیاهان رازیانه به اندازه کافی، تیمار گلدان‌ها با ۳ سطح فواصل آبیاری (۱، ۲ و ۳ روز) آغاز شد. لازم به یادآوری است که رازیانه یک گیاه با نیاز آبی متوسط است و در مزرعه متداول دور آبیاری معمولاً ۷ تا ۱۰ روز یکبار است (Koocheki et al., 2006)، اما شرایط در گلخانه و با توجه به بافت خاک متفاوت است. در این پژوهش، با توجه به اینکه خاک مورد استفاده شنی لومی بوده و چون میزان و حجم آب مصرف شده در هر گلدان محدود و شرایط گلخانه نسبتاً گرم و خشک و تبخیر آب زیاد بوده، آبیاری با فواصل

(Shaw et al., 2014). همچنین گزارش شده است تیمار با نانوذرات مس و اکسید مس (در غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی گرم بر لیتر) فعالیت کاتالاز و اسکوربات پراکسیداز را در یک الگوی وابسته به نوع گیاه و نوع اندام تغییر داد. به طوری که کاهش فعالیت کاتالاز در ریشه و بخش هوایی یونجه و افزایش فعالیت اسکوربات پراکسیداز در ریشه‌های کاهو مشاهده شد (Hong et al., 2015). با توجه به بررسی منابع فوق، لازم است قبل از کاربرد نانوذرات حاوی مس برای بهبود رشد و تحمل تنش خشکی در گیاهان دارویی، غلظت مناسب تعیین شود و سازوکار تأثیر آنها بیشتر مورد بررسی قرار گیرد تا بتوان اثرات منفی آنها را به حداقل رساند (Mosapour Yahyaabadi & Asgharipour 2016).

رازیانه با نام علمی *Foeniculum vulgare* Mill یکی از مهم‌ترین و پرمصرف‌ترین گیاه دارویی متعلق به خانواده چتریان (Apiaceae) و بومی جنوب اروپا و منطقه مدیترانه است. این گیاه در وسعت‌های پهناوری از اروپا بویژه منطقه مدیترانه تا آسیا و ایران پراکنش داشته و محل رویش آن در ایران گرگان، مازندران، آذربایجان، کردستان، کرمان، خراسان، گیلان و شمال منجیل است. این گیاه به واسطه اثرات دارویی متعدد از دیرباز، توجه پژوهشگران را به خود معطوف داشته است و از دیدگاه طب سنتی بذره‌های آن دارای اثر نیرو دهنده، مقوی، اشتها آور، آرام کننده، قاعده آور، زیاد کننده شیر و بادشکن است (Zargari, 1995). علاوه بر این، رازیانه عمدتاً برای استفاده از اسانس حاصل از آن در صنایع مختلف دارویی، غذایی،

اندازه‌گیری محتوای کلروفیل کل و

کاروتنوئیدها: برای اندازه‌گیری رنگیزه‌ها بافت تازه پهنک برگ در هاون به کمک استون ۸۰٪ سائیده شد و پس از صاف کردن، جذب محلول در طول موج‌های ۶۴۵، ۶۶۳ و ۴۷۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر (Pharmacia Biotech Ultrospec 4000) ساخت آمریکا خوانده شد و سپس میزان کلروفیل a, b و کاروتنوئیدها طبق فرمول‌های پیشنهادی (Lichtenthaler & Wellburn, 1983) محاسبه شد. میزان کلروفیل کل از مجموع میزان کلروفیل a, b بدست آمد.

اندازه‌گیری محتوای نسبی آب برگ‌ها:

چند دیسک برگگی تازه از گیاهان هر گلدان برداشت و وزن تر (FW) آنها تعیین شد. سپس دیسک‌ها در آب دیونیزه برای ۷ ساعت شناور شدند و پس از تورژسانس کامل، وزن تورگر (TW) دیسک‌های برگگی اندازه‌گیری شد. وزن خشک آن (DW) بعد از خشک شدن دیسک‌ها در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد آن‌ها به مدت ۷۲ ساعت تعیین شد و از رابطه زیر درصد محتوای نسبی آب برگ‌ها محاسبه شد (Amooaghaie, et al., 2022).

$$\text{RWC} = \frac{\text{FW} - \text{DW}}{\text{TW} - \text{DW}} \times 100 \quad \text{رابطه (۱)}$$

سنجش محتوای پرولین: اندازه‌گیری

پرولین توسط معرف نین‌هیدرین انجام شد و از تولوئن به عنوان بلانک استفاده شد. جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد و مقدار پرولین در هر نمونه با منحنی استاندارد، تعیین

نزدیک ضروری بود و بنابر این فواصل آبیاری فوق انتخاب شد.

برای کاهش آثار تنش خشکی محلول‌پاشی نانوذرات اکسید مس (۰ و ۲/۵ و ۵ و ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر) مطابق طرح آماری و برای گیاهان هر ۳ سطح فواصل آبیاری انجام شد. در این آزمایش از پودر نانوذرات اکسید مس با اندازه ۴۰ نانومتر و خلوص ۹۹ درصد (US3070CAS) خریداری شده از شرکت Research US Nanomaterials Inc. استفاده شد. مخلوط نانوذرات با آب، قبل از استفاده به مدت ۶۲۰ ثانیه توسط امواج اولتراسوند با قدرت ۸۰-۹۰ هرتز و دور ۱۰۰ سونیکیت شدند تا نانوذرات به حالت سوسپانسیونی در آمده و براحتی قابل جذب برای گیاه باشند و از رسوب یا به هم چسبیدن آنها جلوگیری شود. محلول‌پاشی برای هر کدام از گلدان‌ها با ۳۰ میلی‌لیتر به مدت ۵ دقیقه انجام شد. در ضمن برای جلوگیری از ورود نانوذرات به سطح خاک و جذب ریشه‌های آنها توسط گیاه، در مدت محلول‌پاشی، سطح خاک با پلاستیک پوشانده شد. پس از گذشت ۱۰ روز از محلول‌پاشی با نانوذرات، نمونه برگ تازه گیاهان هر تیمار جمع‌آوری شد و به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد آزمایشگاه منتقل شد تا برای اندازه‌گیری محتوای پراکسیداسیون لیپیدی، محتوای پرولین و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی استفاده شود. در پایان گیاهان گلدان‌ها برداشت و فوراً وزن تر اندازه‌گیری شد و سپس به آن ۷۰ درجه سانتی‌گراد منتقل و وزن خشک گیاه تعیین شد.

کاتالاز بر مبنای تغییرات جذب نوری محلول در طول موج ۲۴۰ نانومتر در طی دو دقیقه بر مبنای میزان مصرف H_2O_2 و با ضریب خاموشی $39/4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ برآورد شد. در نهایت میزان فعالیت ویژه هر دو آنزیم بر اساس واحد آنزیم بر میلی گرم وزن تر محاسبه و بیان شد (Amooaghaie et al., 2017; 2018).

طرح و تحلیل آماری

آزمایش گلدانی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با ۳ سطح فواصل آبیاری (آبیاری با فواصل ۱، ۲ و ۳ روز) و ۵ سطح محلول پاشی نانوذرات اکسید مس (صفر، ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰) با ۳ تکرار در گلخانه دانشگاه شهرکرد انجام شد. آنالیز واریانس داده‌ها با نرم افزار SAS نسخه ۲۰ و مقایسه میانگین داده‌ها بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. نمودارها با کمک نرم افزار Excel رسم شد.

نتایج

اثر متقابل نانوذرات اکسید مس و فواصل آبیاری بر وزن تر و وزن خشک رازیانه

نتایج آنالیز واریانس (جدول ۱) نشان دادند اثر مستقل فواصل آبیاری و نانوذرات بر وزن خشک و وزن تر گیاه رازیانه در سطح احتمال ۱ درصد و اثر متقابل آنها در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول ۱).

شد. نتایج حاصل از اندازه‌گیری مقدار پرولین بر حسب گرم وزن تر محاسبه و ارائه شدند (Bates et al., 1973).

برآورد تنش اکسیداتیو: برای اندازه‌گیری

غلظت مالون‌دی‌آلدئید (MDA)، ۰/۲ گرم از بافت تازه برگ در هاون چینی حاوی ۵ میلی‌لیتر اسید تری کلرواستیک (TCA)، ۰/۱ درصد سائیده شد و با تیوباریتوریک (TBA) طی مراحل یک کمپلکس قرمز رنگ حاصل شد. شدت جذب این محلول در طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد. جذب بقیه رنگیزه‌های غیر اختصاصی در ۶۰۰ نانومتر تعیین و از این مقدار کسر شد. برای محاسبه غلظت از ضریب خاموشی معادل $155 \text{ mM}^{-1} \text{ Cm}^{-1}$ استفاده شد (Heath & Packer, 1968).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های

آنتی‌اکسیدان: برای استخراج آنزیم‌ها ابتدا نمونه برگ در بافر فسفات حاوی EDTA و Triton با $\text{pH}=7/8$ سائیده و سانتریفیوژ شد و روشناور حاصل، برای سنجش فعالیت آنزیم‌ها استفاده شد. برای اندازه‌گیری آنزیم آسکوربات پراکسیداز ۵۰ میکرولیتر از روشناور حاوی آنزیم، ۳ میلی‌لیتر بافر فسفات، ۱۰۰ میکرولیتر آسکوربات و ۴/۵ میکرولیتر هیدروژن پراکسید داخل کووت ریخته و تغییرات جذب نوری محلول در طول موج ۲۹۰ نانومتر، در فواصل ۳۰ ثانیه و به مدت ۱۲۰ ثانیه خوانده شد. میزان فعالیت آنزیم بر اساس میزان مصرف H_2O_2 در دقیقه و با ضریب خاموشی $2/6 \text{ mM}^{-1} \text{ Cm}^{-1}$ برآورد شد. یک واحد فعالیت

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس مربوط به تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید مس و فواصل آبیاری بر وزن تر و خشک و رنگیزه‌های فتوسنتزی در برگ رازیانه

Table 1- The result of analysis of variance related to the effect of different concentrations of CuO nanoparticles and irrigation intervals on fresh and dry weight and content of photosynthetic pigments in leaves of *Foeniculum vulgare*

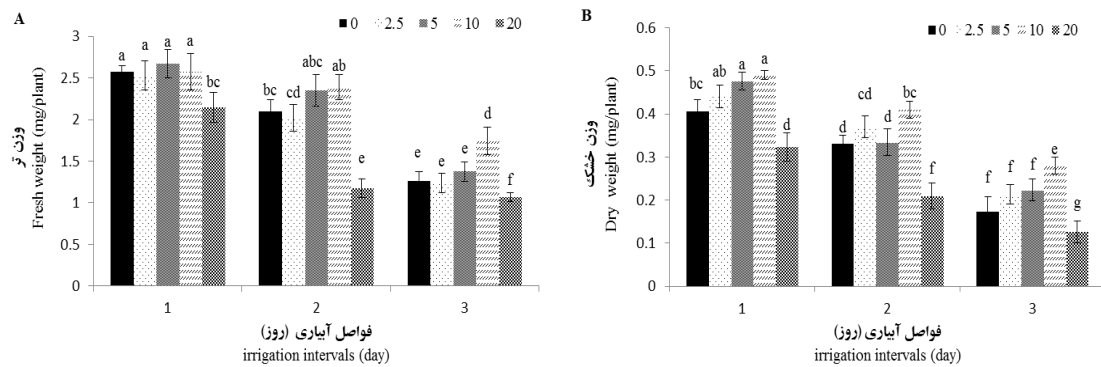
	درجه آزادی df	وزن تر Fresh weight	وزن خشک Dry weight	کلروفیل کل Total Chlorophyll	محتوای کاروتنوئید Carotenoid content
فواصل آبیاری Irrigation intervals (I)	2	5.09**	0.19**	41.67**	3.32**
نانوذرات Nanoparticles (N)	4	0.78**	0.03**	2.002**	0.46**
فواصل آبیاری × نانوذرات I×N	8	0.12*	0.0023*	0.1*	0.08**
خطا Error	30	0.03	0.001	0.02	0.008

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

* and, ** show significant differences at 5 and 1% probability level, respectively

بطور معنی‌داری کاهش یافت. در فواصل آبیاری ۲ و ۳ روزه، وزن تر و خشک فقط با کاربرد غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات اکسید مس در حد معنی‌داری نسبت به شاهد این گروه‌ها افزایش و در مقابل با کاربرد غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات در حد معنی‌داری نسبت به شاهد این گروه‌ها کاهش یافت (شکل ۱).

در فواصل آبیاری ۲ و ۳ روزه وزن تر و خشک گیاه در حد معنی‌داری نسبت به شاهد کاهش یافت (شکل ۱). در شرایط بدون تنش (فواصل آبیاری ۱ روزه)، فقط وزن خشک گیاه با کاربرد غلظت ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات افزایش یافت و وزن تر تغییر معنی‌داری نداشت، اما با محلول‌پاشی غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر وزن تر و خشک گیاه



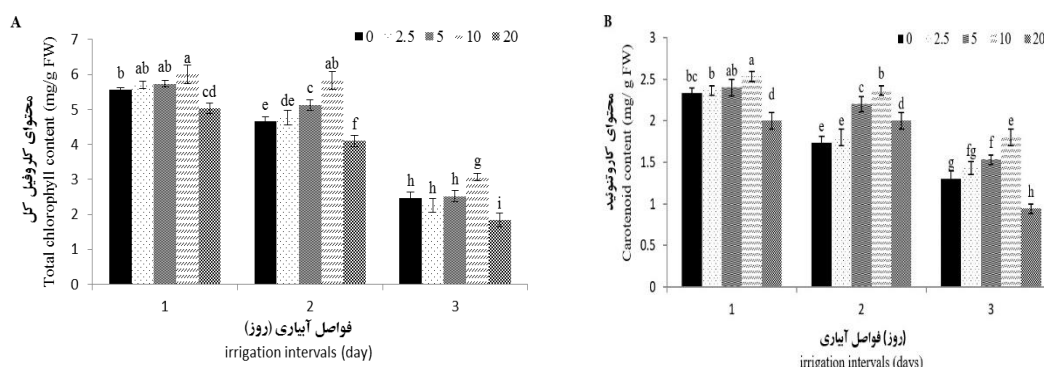
شکل ۱- تأثیر بر همکنش فواصل آبیاری (۱، ۲ و ۳ روزه) و غلظت نانوذرات اکسید مس (۰، ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر) بر وزن تر (A) و خشک (B) رازیانه، داده‌ها میانگین سه تکرار \pm SE هستند و حروف یکسان عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارها بر طبق آزمون دانکن را نشان می‌دهد.

Figure 1- Interactive effect of irrigation intervals (1, 2, and 3 days) and the concentrations of CuO nanoparticles (0, 2.5, 5, 10 and 20 mg/L) on fresh (A) and dry (B) weights of *Foeniculum vulgare*. The data are means of 3 replications \pm SE and same letters indicate non-significant differences between treatments according to Duncan's multiple range tests.

۱ درصد و تأثیر متقابل آنها بر محتوای کلروفیل کل در سطح احتمال ۵ درصد، اما بر محتوای کاروتنوئید در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار بود (جدول ۱).

اثر متقابل نانوذرات اکسید مس و فواصل آبیاری بر رنگ‌های فتوسنتزی برگ رازیانه

نتایج آنالیز واریانس نشان دادند تأثیر مستقل فواصل آبیاری و نانوذرات بر محتوای کلروفیل کل و کاروتنوئید در برگ رازیانه در سطح احتمال



شکل ۲- تأثیر بر همکنش فواصل آبیاری (۱، ۲ و ۳ روزه) و غلظت نانوذرات اکسید مس (۰، ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی گرم در لیتر) بر محتوای کلروفیل کل (A) و کاروتنوئید (B) برگ رازیانه، داده‌ها میانگین سه تکرار \pm SE هستند و حروف یکسان عدم اختلاف معنی دار بین تیمارها بر طبق آزمون دانکن را نشان می‌دهند.

Figure 2- Interactive effect of irrigation intervals (1, 2, and 3 days) and the concentrations of CuO nanoparticles (0, 2.5, 5, 10 and 20 mg/L) on the contents of total Chl. (A) and carotenoids (B) in leaves of *Foeniculum vulgare*. The data are means of 3 replications \pm SE and same letters indicate non-significant differences between treatments according to Duncan's multiple range tests.

معنی داری نسبت به شاهد این گروه‌ها افزایش و در مقابل با کاربرد غلظت ۲۰ میلی گرم بر لیتر نانوذرات در حد معنی داری نسبت به شاهد این گروه‌ها کاهش یافت (شکل ۲).

با افزایش فواصل آبیاری به ۲ و ۳ روز محتوای کلروفیل و محتوای کاروتنوئیدها در حد معنی داری کاهش یافت (شکل ۲). بررسی تأثیر متقابل فواصل آبیاری و نانوذرات اکسید مس نشان دادند در فاصله آبیاری یک روزه فقط تأثیر کاربرد غلظت ۱۰ میلی گرم بر لیتر نانوذرات اکسید مس سبب افزایش معنی دار محتوای کلروفیل کل و کاروتنوئید شد، اما با محلول پاشی غلظت ۲۰ میلی گرم بر لیتر، محتوای این رنگیزه‌ها بطور معنی داری کاهش یافت (شکل ۲). در فواصل آبیاری ۲ و ۳ روزه، محتوای کلروفیل کل و کاروتنوئید با کاربرد دو غلظت ۵ و ۱۰ میلی گرم بر لیتر نانوذرات اکسید مس در حد

تأثیر متقابل نانوذرات اکسید مس و فواصل آبیاری بر پرولین و محتوای آب برگ

نتایج آنالیز واریانس (جدول ۲) نشان داد تأثیر مستقل فواصل آبیاری و نانوذرات اکسید مس و نیز تأثیر متقابل آنها بر محتوای پرولین و محتوای نسبی آب برگ رازیانه در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار بود.

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس مربوط به تأثیر غلظت اکسید مس و فواصل آبیاری بر محتوای نسبی آب (RWC)، محتوای پرولین، محتوای مالون دی آلدئید (MDA)، فعالیت کاتالاز (CAT) و آسکوربات پراکسیداز (APX) در برگ رازیانه

Table 2- The result of analysis of variance related to the effect of different concentrations of CuO nanoparticles and irrigation intervals on on relative water content, content of malondealdehyde and proline, the activities of APX and CAT in leaves of *Foeniculum vulgare*

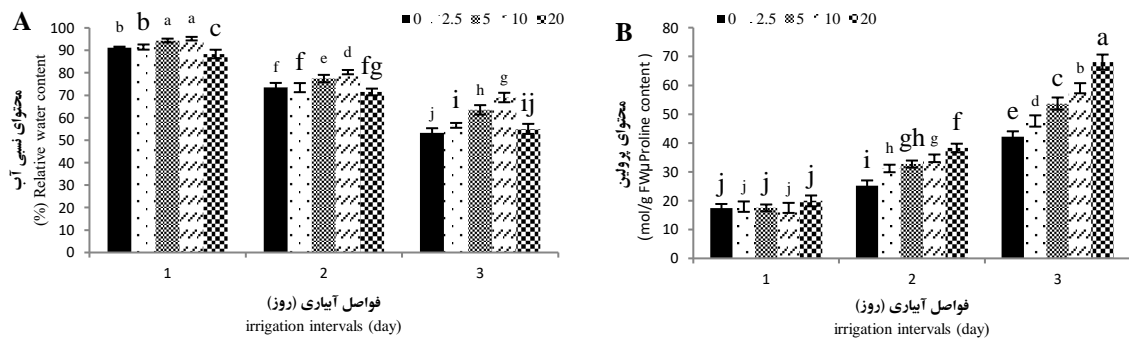
	درجه آزادی	محتوای نسبی آب	محتوای پرولین	محتوای مالون دی آلدئید	فعالیت کاتالاز	اسکوربات پراکسیداز
	df	RWC	Proline	MDA	CAT	APX
فواصل آبیاری	2	393.67**	49.19**	392.01**	2780.63**	1476.26**
Irrigation intervals (I)						
نانوذرات	4	98.6**	24.16**	37.38**	169.95**	279.86**
Nanoparticles (N)						
فواصل آبیاری × نانوذرات	8	15.88**	6.77**	5.85**	99.42**	54.38**
I×N						
خطا Error	30	2.57	3.11	2.68	4.45	0.95

** معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد

** significant differences at 1% probability level

۵ و ۱۰ میلی گرم بر لیتر نانوذرات به ملایمت محتوای نسبی آب (شکل ۳A) را افزایش داد، اما هیچ کدام از غلظت‌های نانوذرات اکسید مس تفاوت معنی داری در محتوای پرولین (شکل ۳B) نسبت به شاهد این گروه ایجاد نکرد.

با افزایش فواصل آبیاری به ۲ و ۳ روز محتوای نسبی آب برگ کاهش (شکل ۳A) و محتوای پرولین افزایش یافت (شکل ۳B)، که این تغییرات نسبت به شاهد کاملاً معنی دار بود. در شرایط بدون تنش (فواصل آبیاری ۱ روزه)، کاربرد غلظت‌های



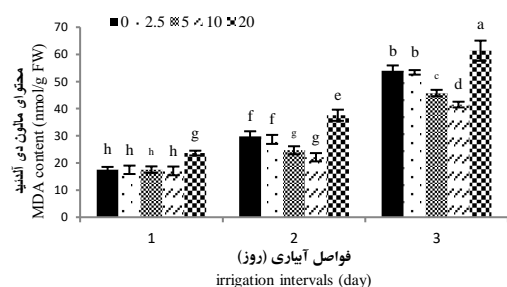
شکل ۳- تأثیر بر همکنش فواصل آبیاری (۱، ۲ و ۳ روزه) و غلظت نانوذرات اکسید مس (۰، ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی گرم در لیتر) بر محتوای نسبی آب (A) محتوای پرولین (B) برگ رازیانه، داده‌ها میانگین سه تکرار \pm SE هستند و حروف یکسان عدم اختلاف معنی دار بین تیمارها بر طبق آزمون دانکن را نشان می‌دهند.

Figure 3- Interactive effect of irrigation intervals (1, 2, and 3 days) and the concentrations of CuO nanoparticles (0, 2.5, 5, 10 and 20 mg/L) on relative water content (A) and proline content (B) in leaves of *Foeniculum vulgare*. The data are means of 3 replications \pm SE and same letters indicate non-significant differences between treatments according to Duncan's multiple range tests.

محتوای پرولین برگ را نسبت به شاهد این گروه‌ها افزایش داد (به استثنای غلظت ۲/۵ روی محتوای نسبی آب در فواصل ۲ روزه آبیاری). در این

در فواصل آبیاری ۲ و ۳ روزه، کاربرد همه غلظت‌های ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی گرم بر لیتر نانوذرات اکسید مس در حد معنی داری محتوای نسبی آب و

محتوای مالون دی آلدئید افزایش معنی دار ۳۴/۵۸ درصدی را نسبت به شاهد گروه خود نشان داد (شکل ۴). در فواصل آبیاری ۲ و ۳ روزه، کاربرد غلظت‌های ۲/۵، اثر معنی داری نداشت، اما کاربرد غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی گرم بر لیتر نانوذرات اکسید مس محتوای مالون دی آلدئید را به ترتیب به میزان ۱۶/۹۴ و ۲۵/۵۸ درصد در فاصله آبیاری دو روزه و ۱۵/۱۵ و ۲۳ درصد در فاصله آبیاری دو روزه کاهش داد که نسبت به شاهد این گروه‌ها معنی دار بود. در فواصل آبیاری ۲ و ۳ روزه، کاربرد غلظت ۲۰ میلی گرم بر لیتر نانوذرات اکسید مس محتوای مالون دی آلدئید را نسبت به شاهد این گروه‌ها در حد معنی داری افزایش داد (شکل ۴).



شکل ۴- تأثیر بر همکنش فواصل آبیاری (۱، ۲ و ۳ روزه) و غلظت نانوذرات اکسید مس (۰، ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی گرم بر لیتر) بر محتوای مالون دی آلدئید (MDA) در برگ رازیانه، داده‌ها میانگین سه تکرار \pm SE هستند و حروف یکسان عدم اختلاف معنی دار بین تیمارها برطبق آزمون دانکن را نشان می‌دهند.

Figure 4- Interactive effect of irrigation intervals (1, 2, and 3 days) and the concentrations of CuO nanoparticles (0, 2.5, 5, 10 and 20 mg/L) on the contents of malonaldehyde (in leaves of *Foeniculum vulgare*). The data are means of 3 replications \pm SE and same letters indicate non-significant differences between treatments according to Duncan's multiple range tests.

فواصل آبیاری با کاربرد غلظت ۲۰ میلی گرم بر لیتر نانوذرات محتوای نسبی آب در حد معنی داری نسبت به غلظت ۱۰ میلی گرم بر لیتر نانوذرات کاهش یافت و با شاهد این گروه‌ها در یک سطح قرار گرفت (شکل ۳A). در حالی که در فواصل آبیاری ۲ و ۳ روزه، کاربرد غلظت ۲۰ میلی گرم بر لیتر نانوذرات محتوای پرولین را نسبت به غلظت ۱۰ میلی گرم بر لیتر نانوذرات و شاهد این گروه‌ها افزایش داد (شکل ۳B). با کاربرد غلظت‌های ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی گرم بر لیتر نانوذرات اکسید مس در فاصله آبیاری دو روزه، محتوای پرولین به ترتیب ۲۳/۸۷، ۲۹/۹۶، ۳۷/۹۱ و ۵۲/۰۹ درصد و در فاصله آبیاری سه روزه محتوای پرولین به ترتیب ۱۲/۹۸، ۲۷/۲۹، ۳۹/۹۴ و ۶۱/۳۶ درصد نسبت به شاهد گروه خود افزایش یافت (شکل ۳B).

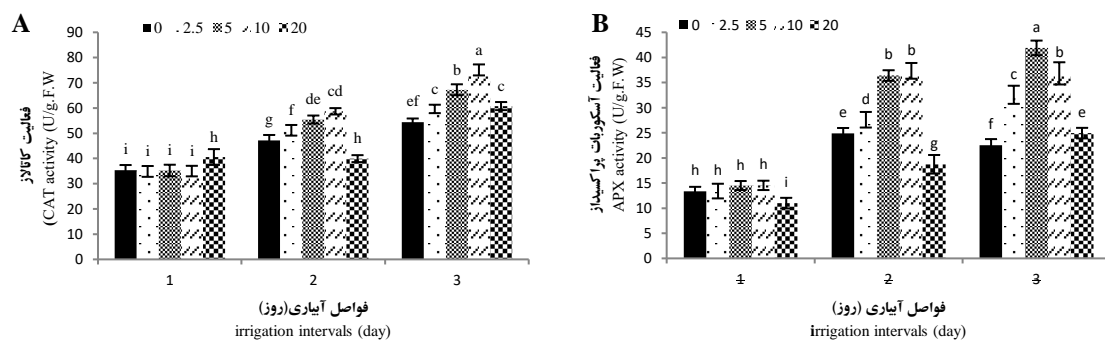
اثر متقابل نانوذرات اکسید مس و فواصل آبیاری بر محتوای مالون دی آلدئید

نتایج آنالیز واریانس (جدول ۲) نشان داد تأثیر مستقل فواصل آبیاری و نانوذرات اکسید مس و نیز تأثیر متقابل فواصل آبیاری و نانوذرات اکسید مس بر محتوای مالون دی آلدئید در برگ رازیانه در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار بود. با افزایش فواصل آبیاری به ۲ و ۳ روزه، میزان مالون دی آلدئید در برگ رازیانه بطور معنی داری افزایش یافت (شکل ۴). در فاصله آبیاری یک روزه کاربرد غلظت‌های ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی گرم بر لیتر نانوذرات اکسید مس تفاوت معنی داری در محتوای مالون دی آلدئید نسبت به شاهد ایجاد نکردند، اما با کاربرد غلظت ۲۰ میلی گرم بر لیتر نانوذرات اکسید مس

تأثیر متقابل نانوذرات اکسید مس و فواصل آبیاری بر فعالیت‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

با توجه به نتایج آنالیز واریانس (جدول ۲) تأثیر مستقل فواصل آبیاری و نانوذرات اکسید مس و نیز تأثیر متقابل این فاکتورها بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز برگ در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. با افزایش

فواصل آبیاری به ۲ و ۳ روز فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز در برگ رازیانه بطور معنی‌داری نسبت به شاهد (آبیاری یک روزه و بدون تیمار نانوذرات) افزایش یافت (شکل ۵). به هر حال فعالیت آسکوربات پراکسیداز در فاصله آبیاری ۳ روزه در حد معنی‌داری کمتر از فاصله آبیاری ۲ روزه بود (شکل ۵B).



شکل ۵- تأثیر بر همکنش فواصل آبیاری (۱، ۲ و ۳ روزه) و غلظت نانوذرات اکسید مس (۰، ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی گرم در لیتر) بر فعالیت آنزیم کاتالاز (A) و آسکوربات پراکسیداز (B) در برگ رازیانه، داده‌ها میانگین سه تکرار \pm SE هستند و حروف یکسان عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارها بر طبق آزمون دانکن را نشان می‌دهند.

Figure 5- Interactive effect of irrigation intervals (1, 2, and 3 days) and the concentrations of CuO nanoparticles (0, 2.5, 5, 10 and 20 mg/L) on the activity of CAT (A) and APX (B) in leaves of *Foeniculum vulgare*. The data are means of 3 replications \pm SE and same letters indicate non-significant differences between treatments according to Duncan's multiple range tests.

اکسید مس در حد معنی‌داری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز را نسبت به شاهد این گروه‌ها افزایش داد و بیشترین فعالیت کاتالاز در غلظت ۱۰ و بیشترین فعالیت آسکوربات پراکسیداز در غلظت ۵ میلی گرم بر لیتر نانوذرات بدست آمد. در این فواصل آبیاری با کاربرد غلظت ۲۰ میلی گرم بر لیتر نانوذرات فعالیت هر دو آنزیم در حد معنی‌داری نسبت به غلظت ۱۰ میلی گرم بر لیتر نانوذرات در این گروه‌ها کاهش یافت (شکل ۵).

در شرایط آبیاری یک روزه، کاربرد غلظت‌های ۲/۵ تا ۱۰ میلی گرم بر لیتر نانوذرات تفاوت معنی‌داری در فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز (شکل ۵) نسبت به شاهد این گروه ایجاد نکرد. با کاربرد ۲۰ میلی گرم بر لیتر نانوذرات آنزیم آسکوربات پراکسیداز بطور معنی‌داری کاهش و فعالیت آنزیم بطور معنی‌داری نسبت به شاهد این گروه افزایش یافت. در فواصل آبیاری ۲ و ۳ روزه، کاربرد همه غلظت‌های ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی گرم بر لیتر نانوذرات

بحث

خشکی، تنش اسمزی را بر گیاه تحمیل می‌کند که سبب کاهش جذب آب و کاهش وزن تر گیاه می‌شود. علاوه بر این تحت تنش خشکی آبسزیک اسید در ریشه ساخته شده و به برگ منتقل می‌شود که منجر به بسته شدن روزنه‌ها و کاهش ورودی دی‌اکسید کربن و فتوسنتز گیاه و در نتیجه کاهش وزن خشک گیاه می‌شود (Seleiman et al., 2021). رازیانه گیاهی با نیاز آبی متوسط است و در مزرعه متداول دور آبیاری معمولاً ۷ تا ۱۰ روز یکبار است (Koocheki et al., 2006). با وجود این، در این پژوهش با توجه به بافت شنی لومی خاک، محدود بودن حجم آب مصرفی برای هر گلدان و شرایط گرم گلخانه، با افزایش فواصل آبیاری از ۱ به ۲ و ۳ روز، میزان وزن خشک و وزن تر گیاه رازیانه به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. در هر حال محلول پاشی با نانوذرات اکسید مس تا غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر در فواصل آبیاری ۲ و ۳ روزه سبب افزایش اما در غلظت ۲۰ میلی‌گرم در لیتر سبب کاهش وزن خشک و تر گیاه شد (شکل ۱). بطور مشابهی غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات اکسید مس و اکسید روی، بیان ژن مربوط به تولید اکسین و رشد طولی و وزن خشک ریشه و ساقه کلزا را افزایش داد، اما غلظت‌های بالاتر تأثیر معکوس بر این صفات داشتند. بنابراین پژوهشگران نشان دادند نانوذرات اکسید مس در غلظت کم در رابطه با تحریک تولید اکسین، رشد گیاه را تحریک می‌کنند (Rahmani et al., 2016). نقش مس در سنتز اسید آمینه تریپتوفان و تولید اکسین بخوبی اثبات شده است. همچنین غلظت کم مس اثر مثبتی

بر فرآیندهای فیزیولوژیک مانند فتوسنتز، تنفس، تولید هورمون‌های رشد و سنتز ATP دارد و به عنوان یک عنصر ریز مغذی ضروری، رشد گیاه را افزایش می‌دهد. در مقابل مهار رشد گیاهان در حضور غلظت زیاد مس به اختلال در وضعیت آب سلول، میتوز، چرخه سلولی، سخت شدن دیواره سلولی به علت تشکیل لیگنین، به هم خوردگی تعادل هورمونی، کاهش محتوای نیتروژن و پتاسیم و افت کارایی فتوسنتز نسبت داده شده است (Adrees et al., 2015). مشابه با نتایج ما، غلظت‌های بالای نانوذرات اکسید مس سبب لیگنینی شدن دیواره‌ها و در نتیجه محدود شدن رشد گیاهچه خردل هندی شد (Nair & Chung, 2014).

کاهش رشد گیاه تحت تنش کم آبی ممکن است ناشی از کاهش محتوای کلروفیل کل و کاروتنوئید (شکل ۲) در برگ گیاه رازیانه باشد که احتمالاً فتوسنتز و تأمین مواد اولیه برای رشد را کاهش داد. تنش خشکی با افزایش مقدار برخی از هورمون‌ها نظیر اتیلن و اسید آبسزیک، و افزایش فعالیت کلروفیلاز یا با تولید گونه‌های فعال اکسیژن و ایجاد تنش اکسیداتیو موجب تجزیه کلروفیل و آسیب‌پذیری کمپلکس‌های پروتئین-رنگیزه می‌شود (Seleiman et al., 2021). غلظت ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات اکسید مس موجب افزایش محتوای کلروفیل کل و کاروتنوئیدها (شکل ۲) در فواصل آبیاری مختلف شد. بطور مشابهی محلول پاشی با غلظت ۸ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات اکسید مس بهترین تأثیر را بر افزایش رشد و بیوماس، محتوای کلروفیل و نرخ فتوسنتز خالص

پژوهشگران بیان کردند احتمالاً در غلظت‌های بالای نانوذرات، رهایی یون مس زیاد با فعال‌سازی واکنش فتون موجب افزایش تولید رادیکال سوپراکسید و اکسیژن یکتایی در کلروپلاست می‌شود که این رادیکال‌ها به غشای تیلاکوئیدها حمله کرده، سبب آزاد شدن رنگیزه‌ها و تخریب آنها می‌شود (Costa & Sharma, 2016). بطور مشابهی اثر مثبت و منفی غلظت‌های کم و زیاد نانوذرات بر محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی در گندم و گوجه فرنگی تیمار شده با نانوذرات روی و اکسید روی تحت شرایط بدون تنش (Amooaghaie et al., 2017) و در زینان تیمار شده با نانوذرات دی اکسید تیتانیوم (Amooaghaie et al., 2022) تحت تنش شوری قبلاً گزارش شده است. افزایش فواصل آبیاری به ۲ و ۳ روز، منجر به ایجاد تنش اسمزی در گیاه شد که به صورت کاهش محتوای نسبی آب برگ گیاه رازیانه پدیدار شد و احتمالاً افزایش میزان پرولین (شکل ۳) در این گیاهان یک واکنش برای حفظ وضعیت آبی سلول و یک سازوکار تنظیم اسمزی برای مقابله با خشکی بود. با نانوذرات اکسید مس در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر محتوای نسبی آب بخش هوایی نسبت به شاهد افزایش یافت (شکل ۳). بطور مشابهی، بررسی تأثیر نانوذرات آهن، مس، کبالت و اکسید روی بر گیاهان سویا نشان داد کاربرد این نانوذرات با تأثیر بر بهبود بیوماس و محتوای نسبی آب تحت تنش خشکی، شاخص تحمل خشکی در سویا را افزایش دادند (Linh et al., 2020). افزایش پرولین با کاربرد نانوذرات اکسید مس تحت فواصل آبیاری ۲ و ۳ روزه (شکل ۳) نشان داد احتمالاً

گیاه خردل داشت (Faraz et al., 2022). پژوهش دیگری نشان داد غلظت‌های کم نانوذرات مس موجب افزایش محتوای بتا کاروتن، کاروتنوئیدها، کلروفیل و بهبود رشد در گیاهچه گندم تحت شرایط بدون تنش و همچنین تحت تنش شوری و تنش اسمزی القا شده با پلی اتیلن گلیکول شد (Farooq et al., 2022). مس در غلظت‌های کم به عنوان یک ریزمغذی رشد و میزان سنتز کلروفیل‌ها را افزایش می‌دهد (Adrees et al., 2015). علاوه بر این، افزایش کاروتنوئیدها در پاسخ به نانوذرات مس نیز در حفظ و پایداری کلروفیل‌ها و فتوسنتز تأثیر داشت. کاروتنوئیدها رنگیزه‌هایی هستند که علاوه بر نقش ساختمانی به عنوان گیرنده نوری، با ممانعت از تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن کلروفیل‌ها و فتوسیستم‌ها را از آسیب فوتون‌های اضافی و تنش اکسیداتیو محافظت می‌کنند (Latowski et al., 2011). در هر حال، کاربرد غلظت ۲۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات اکسید مس سبب کاهش میزان کلروفیل کل و کاروتنوئیدها (شکل ۲) در فواصل آبیاری مختلف شد. یکی از علایم رایج سمیت فلزات سنگین کاهش رشد و رنگیزه‌های فتوسنتزی در اثر القای تنش اکسیداتیو است (Amooaghaie, et al., 2012) و احتمال می‌رود در غلظت بالای نانوذرات اکسید مس، رهایی زیاد یون مس در سلول‌ها موجب تخریب اکسیداتیو رنگیزه‌ها شده است. یک پژوهش نشان داد غلظت زیاد نانوذرات اکسید مس موجب به هم ریختگی ساختار کلروپلاست و کاهش محتوای کلروفیل و کارایی فتوسنتز شد و در نتیجه طول و بیوماس گیاهچه برنج را کاهش داد. بنابراین

دی آلدئید در برگ گیاه رازیانه در فواصل آبیاری ۲ و ۳ روزه (شکل ۴) نشان داد تنش خشکی علاوه بر تنش اسمزی، تنش اکسیداتیو هم ایجاد کرده است. در پاسخ به تنش اکسیداتیو ناشی از کم آبی، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در گیاه رازیانه افزایش یافت (شکل ۵). این نتایج با یافته‌های موسی پوریچی آبادی و اصغری پور (Mosapour Yahyaabadi & Asgharipour, 2016)، درباره رازیانه مطابقت دارد. در هر حال محلول پاشی با نانوذرات اکسید مس تا غلظت ۱۰ میلی گرم بر لیتر، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز را در گیاه رازیانه تحت فواصل آبیاری ۲ و ۳ روزه تشدید کرد (شکل ۵) و در رابطه با پاکروبی ROS به وسیله این آنزیم‌ها، تنش اکسیداتیو ناشی از تنش کم آبی را کاهش داد. اما غلظت ۲۰ میلی گرم بر لیتر اثر عکس داشت و پراکسیداسیون لیپید را افزایش داد (شکل ۴). بطور مشابهی پرایم دانه با غلظت ۰/۱۲ درصد نانوذرات مس با افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز تحت تنش شوری و افزایش کاتالاز تحت تنش شوری و تنش اسمزی القا شده با پلی اتیلن گلیکول موجب کاهش تجمع مالون دی آلدئید در گیاهچه گندم شد. اما پرایم دانه با غلظت ۰/۱۶ درصد اثر معکوس داشت و پراکسیداسیون لیپید را تحت شرایط بدون تنش و همچنین تحت هر دو تنش اسمزی و شوری افزایش داد (Farooq et al., 2022). همچنین کاربرد نانوذرات فلزات مس، آهن و کبالت در شرایط مزرعه جوانه زنی و رشد اولیه گیاه را بهبود داد و با تشدید فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز و آسکوربات

تنظیم اسمزی ناشی از افزایش تجمع پرولین در گیاهان تیمار شده با نانوذرات اکسید مس تا حدی عامل بهبود جذب آب و افزایش محتوای نسبی آب در گیاهان رازیانه تحت تنش کم آبی بوده است. بطور جالبی در این پژوهش، با کاربرد نانوذرات اکسید مس با غلظت ۲۰ میلی گرم بر لیتر در حالی که محتوای آب نسبی کاهش یافت، محتوای پرولین افزایش یافت (شکل ۳). پرولین اسید آمینه کلیدی است که مقدار آن در طی تنش‌های محیطی از جمله فلزات سنگین نه تنها به جهت تنظیم اسمزی، بلکه برای حفظ ساختار پروتئین‌ها و خنثی کردن رادیکال‌های آزاد و همچنین به عنوان یک کلات کننده فلزات در گیاه افزایش می‌یابد (Hayat et al., 2012). احتمالاً به همین علت در پژوهش حاضر نیز در غلظت ۲۰ میلی گرم بر لیتر نانوذرات مس، میزان پرولین خیلی بیشتر از سایر غلظت‌ها افزایش یافته است تا یون‌های زیاد مس رها شده از نانوذرات را کلات کند و با پاکروبی رادیکال‌های آزاد اثرات اکسیداتیو ناشی از آنها بر غشاها و پروتئین‌های آنزیمی را تعدیل کند. در تأیید یافته‌های ما، پژوهش دیگری نشان داد در آراییدوپسیس ژن‌های درگیر در سنتز پرولین (*P5CS2*, *P5CS1*) تحت تأثیر تیمار با نانوذرات اکسید مس (۱۰ و ۲۰ میلی گرم بر لیتر) در حد معنی‌داری فراتنظیم می‌شوند (Nair & Chung, 2015). افزایش پرولین در پاسخ به سمیت غلظت بالای نانوذرات اکسید مس در برنج (Costa & Sharma, 2016) و در زینان تیمار شده با نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم (Amooaghaie et al., 2022) نیز گزارش شده است. افزایش محتوای مالون

آزاد مضر مانند هیدروکسیل، پروکسیل، رادیکال آلکوکسیل را از طریق واکنش فنتون افزایش دهند و با حمله این رادیکال‌ها به غشاها و پروتئین‌ها، تنش اکسیداتیو ایجاد می‌کنند (Adrees et al., 2015). تأثیر مثبت غلظت کم مس بر رشد گیاه و تأثیر منفی غلظت بالای مس بر افزایش محتوای مالون دی‌آلدئید و تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در مریم گلی قبلاً گزارش شده است (Pirooz et al., 2021). تأثیر منفی غلظت بالای نانوذرات روی و اکسید روی در گندم و گوجه فرنگی و نانوذرات نقره در خردل سیاه بر رشد و محتوای کلروفیل و تحریک پاسخ‌های دفاعی مانند تجمع پرولین و تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در این گیاهان نیز قبلاً گزارش شده است (Amooaghaie et al., 2017; Amooaghaie et al., 2018).

نتیجه‌گیری

در مجموع نتایج این پژوهش نشان داد تنش کم آبی، با القای تنش اسمزی و اکسیداتیو به گیاه سبب کاهش محتوای نسبی آب گیاه و افزایش میزان پراکسیداسیون لیپیدی غشای سلول شد و همین آثار منجر به کاهش میزان کلروفیل کل و کاروتنوئیدها و رشد گیاه شد. برای مدیریت تنش اسمزی و اکسیداتیو ناشی از کم آبی، تجمع پرولین و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاه دارویی رازیانه افزایش یافت. محلول‌پاشی غلظت‌های مناسب نانوذرات اکسید مس (اغلب ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر) هم این سازوکارهای دفاعی را تقویت نمود و همین امر منجر به بهبود محتوای

پراکسیداز، تحمل خشکی و میزان برداشت ذرت را بطور معنی‌داری افزایش داد (Hoang et al., 2019). افزایش و کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در پاسخ به غلظت‌های کم و زیاد نانوذرات اکسید تیتانیوم در گیاه زنیان تحت تنش شوری نیز قبلاً گزارش شده است (Amooaghaie & Majidi, 2021; Amooaghaie et al., 2022).

یافته‌های این پژوهش، پیشنهاد می‌کند نانوذرات اکسید مس در غلظت ۲۰ میلی‌گرم در لیتر خود به عنوان یک تنش عمل کرده و حتی تحت فواصل آبیاری اروزه (شرایط بدون تنش) هم محتوای مالون دی‌آلدئید را افزایش دادند. بطور مشابهی، کاربرد غلظت بالای نانوذرات مس در کشت هیدروپونیک گشنیز سبب ایجاد سمیت شد و طول ریشه و محتوای کلروفیل را کاهش داد، در حالی که نشت الکترولیت‌ها از غشای ریشه افزایش یافت (Alquraidei et al., 2018). غلظت ۲۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات اکسید مس همچنین سبب تشدید تنش اکسیداتیو در شرایط کم آبی در رازیانه شد. احتمالاً در این شرایط مجموع تنش اکسیداتیو ناشی از کم آبی و غلظت بالای نانوذرات به حدی زیاد بوده است که به خود آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نیز آسیب رسانیده است و فعالیت آنها را کاهش داده (شکل ۵) و در نتیجه تجمع مالون دی‌آلدئید در این تیمارها (شکل ۴) افزایش یافته است. احتمالاً میزان زیاد فلز مس رها شده از نانوذرات، و یا اثرات ناشی از ماهیت فیزیکوشیمیایی ویژه خود نانوذرات در غلظت زیاد، به گونه‌ای است که موجب راه‌اندازی تنش اکسیداتیو در گیاه می‌شود. فلزات فعال از نظر ردوکس، مثل مس می‌توانند تشکیل رادیکال‌های

نانوذرات اکسید مس تأثیر مثبتی در غلبه بر تنش اسمزی و اکسیداتیو ناشی از کم‌آبی داشت، اما از کاربرد غلظت بالای این نانوذرات برای افزایش تحمل گیاه رازیانه نسبت به تنش خشکی باید اجتناب کرد.

تقدیر و تشکر

از دانشگاه شهرکرد برای پشتیبانی مالی این پژوهش در قالب پایان نامه کارشناسی ارشد تقدیر و تشکر می‌شود.

رنگدانه‌های فتوسنتزی و افزایش رشد گیاه شد. به هر حال غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات اکسید مس در برخی موارد تأثیرات منفی و یا آثار کمتر از سایر غلظت‌ها داشت. احتمالاً غلظت زیاد نانوذرات خود تنش‌زا بوده است، زیرا میزان مالون دی‌آلدئید در این غلظت حتی در گیاهان تحت آبیاری نرمال بیشتر بود و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز، در این غلظت افت کرد و محتوای کلروفیل و وزن تر و خشک گیاه نیز کاهش یافت. بنابراین، بر مبنای اطلاعات این پژوهش، غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر

References

- nanoparticles in coriander (*Coriandrum sativum*—Apiaceae). *Plants*, 8(1), 19. <https://doi.org/10.3390/plants8010019>
- Adrees, M., Ali, S., Rizwan, M., Ibrahim, M., Abbas, F., Farid, M., Zia-ur-Rehman, M., Irshad, M. K., & Bharwana, S. A. (2015) The effect of excess copper on growth and physiology of important food crops: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 8148–8162. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4496-5>.
- Amooaghaie, R. & Majidi, M. (2021) The effect of foliar spraying TiO₂ nanoparticles on biochemical responses, growth, yield and essential oil content of ajowan (*Carum copticum*) under salinity stress. *Journal of Soil and Plant Interactions*, 12(3), 33-55. <https://doi.org/10.47176/jspi.12.3.07661>
- Amooghaie, R., Majidi, M., & Farhadian, S. (2022) Impact of nano-TiO₂ on salt stress tolerance of *Carum copticum*. *Plant Process and Function*, 11, (48), 19-34. <https://doi.org/10.1001.1.23222727.1401.11.48.2.3> [in persian]
- Amooaghaie, R., Marefat, E., & Shabani, L. (2012) Interaction of salicylic acid and cadmium on growth, photosynthetic pigments and ion distribution in arial parts of soybean plantlets. *Journal of Plant Biology*, 14, 75-87.
- Afshari, M., Pazoki, A., & Sadeghipour, O. (2023) Changes of coriander (*Coriandrum sativum* L.) plants under drought stress and foliar application of salicylic acid and silicon nanoparticles. *Journal of Medicinal Plants and By-products*, 3, 197-207. <https://doi.org/10.22092/jmpb.2022.356434.1417>
- Ahmed, A. M. A., Khalid, Kh. A., & Zaki, F. S. A. (2024) Investigating foliar application of bulk and nanoparticles titanium dioxide on fennel productivity to mitigate the negative effects of saline irrigation water. *BMC Plant Biology*, 24, 317. <https://doi.org/10.1186/s12870-024-04996-8>
- Alquraiddi, A. O., Mosa, K. A., & Ramamoorthy, K. (2019) Phytotoxic and genotoxic effects of copper

- Amooaghaie R, Tabatabaei F, & Ahadi A. (2018) Alterations in *Ho-1* expression, heme oxygenase activity and endogenous NO homeostasis modulate antioxidant responses of *Brassica nigra* against nano silver toxicity. *Journal of Plant Physiology*, 228, 75–84. <https://doi:10.1016/j.jplph.2018.01.012>.
- Badgujar, S. B., Patel, V., & Bandivdekar, A. (2014) *Foeniculum vulgare* Mill: A review of its botany, phytochemistry, pharmacology, contemporary application, and toxicology. *Biomed Research International*, 4, 32. <https://doi:10.1155/2014/842674>
- Bates, L. S., Waldran, R. P., & Teare, I. D. (1973) Rapid determination of free proline for water studies. *Plant and Soil*, 39, 205-208.
- Costa, M. V. J., & Sharma, P. K. (2016) Effect of copper oxide nanoparticles on growth, morphology, photosynthesis, and antioxidant response in *Oryza sativa*. *Photosynthetica*, 54(1), 110–119. <https://doi:10.1007/s11099-015-0167-5>
- Faraz, A., Faizan, M., Hayat, S., & Alam, P. (2022) Foliar application of copper oxide nanoparticles increases the photosynthetic efficiency and antioxidant activity in *Brassica juncea*. *Journal of Food Quality*, Vol 2022, 5535100. <https://doi:10.1155/2022/5535100>
- Farooq, T., Un Nisa, Z., Hameed, A., Ahmed, T., & Hameed, A. (2020) Metal-based nanoparticles enhance drought tolerance in soybean. *Journal of Nanomaterials*, Vol. 2020, 4056563, <https://doi:10.1155/2020/4056563>
- Gholinezhad, E. (2017) Effect of drought stress and Fe nano-fertilizer on seed yield, morphological traits, essential oil percentage and yield of dill (*Anethum graveolens* L.). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 20(4), 1006-1017. <https://doi:10.1080/0972060X.2017.1362999>
- Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M. N., Wani, A. S., Pichtel, J., & Ahmad, A. (2012) Role of proline under changing environments: a review. *Plant Signaling and Behavior*, 7, 1456-1466. <https://doi:10.4161/psb.21949>
- Heath, R. L., & Packer, L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplast: I Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125, 189-198.
- Hoang, S. A., Nguyen, L. Q., Nguyen, N. H., Tran, C. Q., Nguyen, D. V., Le, N. T., Ha, C. V., Vu Q. N., & Phan, C. M. (2019) Metal nanoparticles as effective promoters for maize production. *Scientific Report*, Vol 9, 13925. <https://doi:10.1038/s41598-021-81981-3>
- Hong, J., Rico, C. M., Zhao, L., Adeleye, A. S., Keller, A. A. Peralta-vidua, J. R., & Gardea-Torresdey, J. L. (2015) Toxic effects of copper-based nanoparticles or compounds to lettuce (*Lactuca sativa*) and alfalfa (*Medicago sativa*). *Environmental Science: Process and Impact*, 17, 177-185. <https://doi:10.1039/C4EM00551A>. 10.3390/ijms161125980.
- Koocheki, A., Nasiri mahalati, M., & Azizi, E. (2006) The effect of different irrigation intervals and plant densities on yield and yield components of two fennel (*Foeniculum vulgare*) landraces. *Iranian Journal of Field Crops Research*, 4(1), 131-140. <https://doi:10.22067/gsc.v4i1.1323>
- Latowski, D., Kuczynska, P., & Strzalka, K. (2011) Xanthophyll cycle- a mechanism protecting plants against oxidative stress. *Redox Report*, 16, 78-90. <https://doi:10.1179/174329211x13020951739938>
- Lichtenthaler, H. K., & Wellburn, A. R. (1983) Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents.

- Biochemical Society Transactions*, 11, 591–592. <https://doi.org/10.1042/bst0110591>.
- Linh, T. M., Mai, N. C., Hoe, P. T., Lien, L. Q., Ban, N. K., Thu, Hien, L. T., Chau, N. H., & Van, N. T. (2020) Metal-based nanoparticles enhance drought tolerance in soybean. *Journal of Nanomaterials*, Vol 2020, 4056563. <https://doi.org/10.1155/2020/4056563>
- Mosapour Yahyaabadi, H., & Asgharipour, M. R. (2016) Effects of drought stress and its interaction with silicon on stimulates the antioxidant system and lipid peroxidation in fennel (*Foeniculum vulgare*). *Plant Process and Function*, 5 (16), 71-84. <https://doi.org/10.1001.1.23222727.1395.5.16.8.3> [in persian]
- Mustafa, H. S., Oraibi, A. G., Ibrahim, K. M. & Ibrahim, N. K (2017) Influence of silver and copper nanoparticles on physiological characteristics of *Phaseolus vulgaris* L. *in vitro* and *in vivo*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*, 6, 834-843. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.601.098>
- Nair, P. M., & Chung, I. M. (2014) Impact of copper oxide nanoparticles exposure on *Arabidopsis thaliana* growth, root system development, root lignification, and molecular level changes. *Environmental Science and Pollution Research*, 21, 12709-12722. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3210-3>.
- Nair, P. M., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.12.013>
- Nguyen, D. V., Nguyen, H. M., Le, N. T., Nguyen, K. H., Le, H. M., Nguyen, A. T., Dinh, N. T. T., Hoang S. A., & Ha C. V. (2022) Copper nanoparticle application enhances plant growth and grain yield in maize under drought stress conditions. *Journal of Plant Growth Regulation*, 41, 364–375. <https://doi.org/10.1101/2020.02.24.963132>
- Osakabe, Y., Osakabe, K., Shinozaki, K., & Tran, L. S. (2014) Response of plants to water stress. *Frontier Plant Science*, 5, 86. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00086>
- Pirooz, P., Amooaghaie, R., Ahadi, A. M., & Sharififar, F. (2021) Silicon- induced nitric oxide burst modulates systemic defensive responses of *Salvia officinalis* under copper toxicity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 162, 752–761. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.02.048>.
- Rahmani, F., Peymani, A., Daneshvand, E., & Biparva, P. (2016) Impact of zinc oxide and copper oxide nano-particles on physiological and molecular processes in *Brassica napus* L. *Indian Journal of Plant Physiology*, 21, 122-128. <https://doi.org/10.1007/s40502-016-0212-9>
- Rajput, V. D., Minkina, T., Suskova, S., et al. (2018) Effects of copper nanoparticles (CuO NPs) on crop plants: a mini review. *BioNanoScience*, 8(1), 36-42. <https://doi.org/10.1007/s12668-017-0466-3>
- Shaw, A. K., Ghosh, S., Kalaji, H. M., Bosa, K., Brestic M., Zivcak M, & Hossain, Z. (2014) Nano-CuO stress induced modulation of antioxidative defense and photosynthetic performance of Syrian barley (*Hordeum vulgare* L.). *Environmental and Experimental Botany*, 102, 37–47. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.02.016>
- Seleiman, M. F., Al-Suhaibani, N., Ali, N., Akmal, M., Alotaibi, M., Refay, Y., Dindaroglu, T., Abdul-Wajid, H. H., & Battaglia, M. L. (2021) Drought stress impacts on plants and different approaches to alleviate its adverse effects. *Plants*, 10, 259. <https://doi.org/10.3390/plants10020259>

- Singh, N. B., Hussain, I., & Singh, H. (2017) Effect of biologically synthesized copper oxide nanoparticles on metabolism and antioxidant activity to the crop plants *Solanum lycopersicum* and *Brassica oleracea* var. botrytis. *Journal of Biotechnology*, 262, 11-27. <https://doi:10.1016/j.jbiotec.2017.09.016>
- Thiruvengadam, S., Ganesan, M., & Varadharajaperumal, P. (2021) Impact of foliar application of copper nanoparticles on growth of *Zea mays*. *Bioscience Biotechnology Research Communications*, 14(3), <https://doi:10.21786/bbrc/14.3.50>
- Xiong, T., Dumat, C., Dappe, V., Vezin, H., Schreck, E., Shahid, M., Pierart, A., Sobanska, S. (2017) Copper oxide nanoparticle foliar uptake, phytotoxicity, and consequences for sustainable urban agriculture. *Environmental Science and Technology*, 51(9), 5242–5251. <https://doi:10.1021/acs.est.6b05546>
- Zhao, L., Lu, L., Wang, A., Zhang, H., Huang, M., Wu, H., Xing, B., Wang, Z., & Ji, R. (2020) Nano-biotechnology in agriculture: use of nanomaterials to promote plant growth and stress tolerance. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 68(7), 1935-1947. <https://doi:10.1021/acs.jafc.9b06615>
- Zlatev, Z., & Lidon, F. C. (2012) An overview on drought induced changes in plant growth, water relations and photosynthesis. *Emirate Journl of Food Agriculture*, 24, 57-72.
- Zargari, A. (1995) *Pharmaceutical Plants*. vol. 2. Tehran University Publisher.

