



DOR: [20.1001.1.17354226.1400.16.3.6.3](https://doi.org/10.1001.1.17354226.1400.16.3.6.3)

Original article

Investigation of structural and ultrastructural changes of canola (*Brassica napus* L.) leaf under cobalt oxide nanoparticles treatment

Malihe Jahani^{1*}, Ramazan Ali Khavari-Nejad¹, Homa Mahmoodzadeh², Sara Saadatmand¹, Sedighe Jahani¹

1. Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

*Corresponding author: e-mail: malihe.jahani2009@gmail.com

Received: 04/04/2022

Accepted: 05/22/2022

Abstract

Cobalt oxide nanoparticles (Co_3O_4 NPs) are one of the most widely used magnetic NPs in various industries and their interactions with the environment are predictable. The aim of this study was to investigate the impact of Co_3O_4 NPs on leaf structure and ultrastructure of canola. Seeds were sown in pots under greenhouse conditions and after two weeks, seedlings were treated with Co_3O_4 NPs (0 and 4000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) by leaf spray for five weeks. Then, leaf morphological changes were measured. Also, sampling from control leaf and NPs treatment were performed to investigate structural and ultrastructural changes. Tissue preparation was performed and samples were examined by light and transmission electron microscopy (TEM). Morphological changes including reduction in the length, width and area of leaf of canola treated with Co_3O_4 NPs were observed. Also, ultrastructural changes of canola leaf mesophilic cells treated with Co_3O_4 NPs including reduction of chloroplasts number and their swelling, accumulation and deposition of NPs in vacuoles and cell walls, observation of protein bodies, increase in the size of plastoglobules and starch grains in chloroplasts were observed. In addition, the results of cobalt elemental assay by methods of inductive coupled plasma emission spectrometry (ICP-OES) and energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX), in line with TEM results, showed the uptake and accumulation of Co_3O_4 NPs in canola leaves. Ultrastructural damage in TEM results indicated the toxicity of high concentration of Co_3O_4 NPs at the cellular level. Therefore, potential of hazardous effects of Co_3O_4 NPs on other crops and environment should be considered.

Keywords: Inductive coupled plasma emission spectrometry (ICP-OES), Energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX), Canola, Transmission electron microscopy (TEM), Cobalt oxide nanoparticles

مقاله تحقیقی

بررسی تغییرات ساختاری و فراساختاری برگ گیاه کلزا (*Brassica napus L.*) تحت تیمار نانوذرات اکسید کبالت

ملیحه جهانی^{۱*}، رمضانعلی خاوری نژاد^۱، هما محمودزاده^۲، سارا سعادت‌مند^۱، صدیقه جهانی^۱

۱. گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

*مسئول مکاتبات: malihe.jahani2009@gmail.com

محل انجام تحقیق: گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۳۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۱۵

چکیده

نانوذرات اکسید کبالت (Co_3O_4) به‌عنوان یکی از پرکاربردترین نانوذرات مغناطیسی در صنایع مختلف می‌باشند و بر همکنش آن‌ها با محیط‌زیست قابل پیش‌بینی است. هدف از این پژوهش بررسی اثر تیمار نانوذرات Co_3O_4 بر روی ویژگی‌های ساختار و فراساختار برگ گیاه کلزا بود. بذرها در گلدان‌ها تحت شرایط گلخانه‌ای کاشته شدند و بعد از دو هفته، گیاهچه‌ها با نانوذرات Co_3O_4 (۰ و ۴۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به‌صورت اسپری برگی به‌مدت پنج هفته تیمار شدند. سپس تغییرات مورفولوژیکی برگ اندازه‌گیری شد. هم‌چنین نمونه‌برداری از برگ گیاه شاهد و تیمار نانوذرات جهت بررسی تغییرات ساختاری و فراساختاری انجام گردید. مراحل آماده‌سازی بافت انجام شد و نمونه‌ها با میکروسکوپ‌های نوری و الکترونی گذاره (TEM) بررسی شدند. تغییرات مورفولوژیکی شامل کاهش طول، عرض و سطح برگ کلزا تحت تیمار نانوذرات Co_3O_4 مشاهده شد. هم‌چنین تغییرات فراساختاری سلول‌های مزوفیلی برگ گیاه کلزا تحت تیمار نانوذرات Co_3O_4 شامل کاهش تعداد کلروپلاست‌ها و متورم شدن آن‌ها، تجمع و رسوب نانوذرات در واکوئل و دیواره سلولی، مشاهده اجسام پروتئینی، افزایش اندازه پلاستوگلوبول‌ها و دانه‌های نشاسته در کلروپلاست‌ها مشاهده شد. علاوه بر این، نتایج سنجش عنصری کبالت به‌روش‌های اسپکترومتری نشری پلاسمای جفت شده القایی (ICP-OES) و طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDX)، هم‌راستا با نتایج TEM، نشان‌دهنده جذب و تجمع نانوذرات Co_3O_4 در برگ گیاه کلزا بود. آسیب‌های فراساختاری در نتایج TEM بیانگر سمیت غلظت بالای نانوذرات Co_3O_4 در سطح سلولی بود. بنابراین اثرات خطرات احتمالی نانوذرات Co_3O_4 بر روی گیاهان زراعی دیگر و محیط‌زیست باید در نظر گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: اسپکترومتری نشری پلاسمای جفت شده القایی (ICP-OES)، طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDX)، کلزا، میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM)، نانوذرات اکسید کبالت

مقدمه

بذرهای این گیاه، ارزش غذایی و اقتصادی آن را افزایش داده است (۱،۲). کلزا به‌دلیل کیفیت بالای روغن دانه، سازگاری وسیع، مقاومت به خشکی، شوری و سرما در بسیاری از مناطق جهان کشت می‌شود. بذر کلزا به‌طور

کلزا (*Brassica napus L.*) گیاهی یک‌ساله از خانواده چلیپاییان (Brassicaceae) است که یکی از مهم‌ترین گیاهان دانه روغنی در جهان است (۱). درصد بالای پروتئین و اسیدهای چرب غیراشباع مانند اولئیک اسید، هم‌چنین میزان کم اسیدهای چرب اشباع موجود در

اکسید کبالت بر روی گیاهان مختلف بررسی شده است. به‌عنوان مثال در پژوهشی که بر روی چهار گونه گیاهی جوی دوسر، گوجه فرنگی، ذرت و کلم تحت تاثیر غلظت-های ۰ تا ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذرات Co_2O_3 انجام شد، درصد جوانه‌زنی در گوجه‌فرنگی کاهش یافت و رشد ذرت در تمامی غلظت‌ها نیز کاهش یافت (۱۵). در گزارشی دیگر، کاهش طول ریشه بادمجان تحت تاثیر تیمار ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات Co_2O_3 مشاهده شد (۱۳). در پژوهشی دیگر، کاهش جوانه‌زنی بذر و طول ریشه‌چه کاهو تحت تاثیر تیمار ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات اکسید کبالت گزارش شد (۱۴). همچنین پژوهش‌هایی با غلظت‌های بالای نانوذرات اکسید کبالت بر روی گیاهان گزارش شده است از جمله در پژوهشی که بر روی گندم تحت تاثیر غلظت‌های ۰ تا ۸۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذرات کبالت-فريت انجام شد، جوانه زنی بذر و رشد ساقه تحت تاثیر قرار نگرفت اما طول ریشه کاهش یافت. همچنین کاهش رنگدانه‌های فتوسنتزی و کاهش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و گاپاکول پراکسیداز نیز مشاهده شد (۱۶). در پژوهشی دیگر که بر روی بذرهای تربچه و خیار تحت تاثیر غلظت ۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات Co_2O_3 انجام شد، جوانه زنی بذرها تحت تاثیر نانوذرات قرار نگرفت (۱۷). همچنین در پژوهشی دیگر که بر روی جوانه‌زنی بذر، رشد اولیه و پارامترهای فیزیولوژیکی گیاهچه ۶ روزه کلزا تحت تاثیر غلظت‌های ۰ تا ۴۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات Co_2O_3 انجام شد، کاهش درصد و سرعت جوانه‌زنی بذر و همچنین کاهش رشد گیاهچه و افزایش شاخص‌های تنش اکسیداتیو از جمله مالون‌دی‌آلدئید (MDA)^۱، پراکسید هیدروژن (H_2O_2)^۲ و آنزیم لیپواکسیژناز (LOX)^۳ گزارش شد (۱۸).

با توجه به اهمیت توسعه کشت کلزا در جهت رسیدن به خودکفایی در امر تولید روغن خوراکی در کشور و همچنین با توجه به پیشرفت سریع نانوتکنولوژی و افزایش روزافزون استفاده از نانوذرات اکسید کبالت به‌عنوان یکی از پرکاربردترین نانوذرات مغناطیسی در صنایع مختلف و در نتیجه با ورود فاضلاب یا پساب حاصل از محصولات

معمول حاوی ۴۰ تا ۴۸ درصد روغن و کنجاله آن شامل ۳۵ تا ۴۰ درصد پروتئین است (۲).

فناوری نانو، علم و تکنولوژی کاربرد مواد در مقیاس نانومتر (حداقل بین ۱ تا ۱۰۰ نانومتر) است که طی دهه اخیر به‌شدت در عرصه‌های مختلف از جمله کشاورزی و صنایع وابسته به آن رشد چشمگیری داشته است (۳،۴). نانومواد به‌دلیل ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی منحصر به فرد (نسبت بالای سطح به حجم، بار سطحی و اندازه) کاربرد فراوانی در زمینه‌های مختلف صنعتی، کشاورزی، تجاری و پزشکی دارند (۵). تحقیقات گذشته گزارش کردند که قرار گرفتن گیاهان در معرض دوز بالای نانوذرات ممکن است باعث سمیت در گیاهان شود و بر نیاز به دفع مسئولانه زیست محیطی ضایعات و لجن‌های حاوی نانوذرات که در نهایت وارد سیستم خاک می‌شوند، تاکید می‌کند (۶،۷).

کبالت فلزی با عدد اتمی ۲۷ و وزن اتمی ۵۸/۹ گرم بر مول است که معمولاً به دو حالت اکسیداسیون (Co^{+2} و Co^{+3}) وجود دارد (۸). کبالت یک عنصر مغناطیسی با ویژگی مشابه با آهن و نیکل است (۹). کبالت یکی از خطرناک‌ترین فلزات سنگین موجود در محیط‌زیست است (۱۰). قرار گرفتن گیاهان در معرض سطوح بالای کبالت باعث کاهش زیست توده و عملکرد محصول در گیاهان زراعی می‌شود (۱۱). وجود سطوح بالای کبالت در محیط-زیست می‌تواند باعث بروز مشکلات سلامتی متعددی مانند فشار خون پایین، حالت تهوع، بیماری‌های قلبی و ریوی، مشکلات بینایی، عقیمی، آسیب تیروئید، ریزش مو، خونریزی، اسهال، نقص‌های استخوانی و همچنین ممکن است باعث جهش ژنتیکی در سلول‌های زنده شود (۱۰).

نانوذرات اکسید کبالت دارای پتانسیل بالایی برای استفاده به‌عنوان کاتالیزور، سنسورهای گازی، آلیاژهای مغناطیسی، باتری‌های قابل شارژ مجدد، رنگ‌ها، جلادهنده‌ها و لعاب‌ها می‌باشند (۱۲). همچنین نانوذرات Co_2O_3 دارای خصوصیات اپتیکی، الکتروشیمیایی و مغناطیسی بوده و به‌عنوان خازن در وسایل ذخیره‌کننده انرژی استفاده می‌شوند (۱۳). امروزه به‌دلیل کاربرد بی‌رویه نانوذرات اکسید کبالت و انتشار تصادفی یا عمدی آن‌ها در محیط‌زیست، اثرات بالقوه منفی بهداشتی و سمی زیست‌محیطی نانوذرات اکسیدکبالت نکته قابل توجهی را به‌خود جلب کرده است (۱۴). تاکنون تحقیقات اندکی در ارتباط با تاثیر نانوذرات

¹ Malondialdehyde

² Hydrogen peroxide

³ Lipoxigenase

جهت تعیین فاز و درجه خلوص نانوذرات از دستگاه پراش اشعه ایکس (XRD) ⁵ (EXPLOER, GNR, 40 kV, 30 mA, Italy) در طول موج $\lambda=1/54$ آنگستروم استفاده شد. در روش XRD با استفاده از پرتوی X که در محدوده بین پرتو گاما و ناحیه طول موج فرابنفش قرار دارد، می‌توان اطلاعاتی در خصوص ساختار، جنس ماده و نیز تعیین مقادیر عناصر به دست آورد. هر نانوذره ممکن است دارای فازهای اصلی یا فرعی در ساختار خود باشد.

هم‌چنین اندازه‌گیری قطر هیدرودینامیکی⁶ نانوذرات به روش پراکندگی نور دینامیکی (DLS)⁷ توسط دستگاه پارتیکل سایزر آنالیزر (VASCO 3, Cordouan, Pessac, France) براساس تعداد⁸ و با تعیین متوسط سایز قطر هیدرودینامیک⁹ و شاخص پراکندگی¹⁰ انجام شد. بدین-منظور مقدار $0/001$ گرم نانوذرات اکسید کبالت در 10 میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شدند، سپس با استفاده از دستگاه اولتراسونیک (SONICA Ultrasonic Cleaner model 2400 S3, 100 W, 40 Hz) به مدت 30 دقیقه در دمای 25°C همگن شدند. سپس مقدار $0/5$ میلی‌لیتر از آن بر روی جایگاه¹¹ دستگاه تعیین اندازه ذرات (VASCO 3, Cordouan, Pessac, France) قرار داده شد و اندازه نانوذرات اکسیدکبالت در طول موج 657 نانومتر و دمای 25°C تعیین شد.

علاوه بر این، جهت بررسی پایداری کلوئیدهای تشکیل شده نانوذرات، پتانسیل زتا¹² نانوذرات با استفاده از دستگاه زتا سایزر (Zetasizer nano-ZS ZEN3600) سنجش شد. بدین‌منظور 6 میلی‌لیتر سوسپانسیون همگن شده نانوذرات (ذکر شده در قسمت آماده‌سازی نمونه برای DLS) بر روی جایگاه دستگاه پتانسیل زتا (Zetasizer nano-ZS ZEN3600) قرار داده شد و پتانسیل زتا نانوذرات اکسیدکبالت در دمای 22°C اندازه‌گیری شد. هم‌چنین جهت آماده‌سازی نمونه برای آنالیز طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDX)¹³، $0/001$ گرم پودر نانوذرات

نانوفناوری شده به محیط زیست و زمین‌های کشاورزی، آزادسازی این ترکیبات به محیط زیست اجتناب‌ناپذیر می‌باشد و در نتیجه باعث افزایش احتمال فرار گرفتن گیاهان در معرض نانوذرات می‌شود که باعث افزایش خطرات زیست محیطی، آسیب به اکوسیستم‌ها، تنوع زیستی و تولید محصول می‌شود. ضمناً با توجه به این‌که تاکنون پژوهشی بر روی ویژگی‌های ساختاری و فراساختاری کلزای تحت تاثیر نانوذرات اکسید کبالت انجام نشده است و هم‌چنین با اشاره به اهمیت انجام مطالعات ساختاری و فراساختاری که بینش عمیقی در سطح سلولی در زمینه تعامل نانوذرات با گیاهان می‌دهند، هدف از این پژوهش بررسی تاثیر نانوذرات اکسید کبالت بر ویژگی‌های ساختاری و فراساختاری و تجمع کبالت در برگ گیاه کلزا (*Brassica napus L.*) بود.

مواد و روش‌ها

تهیه و آماده‌سازی نانوذرات اکسیدکبالت (NPs)

Co_2O_3 جهت اعمال تیمار

پودر نانوذرات Co_2O_3 از شرکت نانوپیشگامان نانومواد ایرانیان در مشهد خریداری شد. در این پژوهش، غلظت نانوذرات اکسیدکبالت براساس پژوهش‌های گذشته محققان تعیین شد ($16, 17, 18$). جهت تهیه سوسپانسیون نانوذرات Co_2O_3 (4000 میکروگرم بر میلی‌لیتر)، ابتدا مقدار 4 گرم از پودر نانوذرات Co_2O_3 در یک لیتر آب دیونیزه حل شد، سپس ارلن حاوی سوسپانسیون نانوذرات به مدت یک ساعت بر روی شیکر قرار داده شد تا خوب مخلوط شود، آنگاه ارلن را در دستگاه اولتراسوند مدل SONICA Ultrasonic Cleaner model 2400 S3, 100 W, (40 Hz) به مدت 30 دقیقه قرار داده تا سوسپانسیون نانوذرات Co_2O_3 تحت امواج اولتراسونیک قرار گرفته تا به خوبی در آب دیونیزه همگن⁴ شود.

آنالیز خصوصیات نانوذرات اکسید کبالت

نانوذرات اکسیدکبالت به صورت پودر سیاه رنگ با خلوص 99 درصد و دارای چگالی $6/11 \text{ g cm}^{-3}$ بود. آنالیزهای مرتبط با خصوصیات نانوذرات اکسید کبالت در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد.

⁴ Dispersion

⁵ X-ray diffractometer

⁶ Hydrodynamic diameter

⁷ Dynamic light scattering

⁸ Number

⁹ Z average

¹⁰ Polydispersity index (PDI)

¹¹ Cell

¹² Zeta potential

¹³ Energy-dispersive X-ray spectroscopy

های مختلف رزین و پروپیلن اکسید (۳ به ۱، ۱ به ۱ و ۱ به ۳) برای نفوذ رزین استفاده شد. پس از نفوذ رزین، نمونه‌ها قالب‌گیری شدند و در آون در دمای 60°C به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفتند. برش‌های نیمه‌نازک (با ضخامت 0.5 میکرون) و بسیار نازک (با ضخامت 80 تا 60 نانومتر) با استفاده از تیغ الماس و به کمک دستگاه اولترامیکروتوم^{۱۶} (Ultracut UCT, Leica, Austria) تهیه شدند. برش‌های نیمه‌نازک با آبی تولوئیدین^{۱۷} در سدیم بورات 1% به مدت ۲ تا ۳ دقیقه، رنگ‌آمیزی شده و سپس ساختار برگ با میکروسکوپ نوری (Olympus BX 51, Japan) متصل به دوربین دیجیتال (Olympus DP 71) مشاهده و مورد بررسی قرار گرفت (۱۹). برش‌های بسیار نازک بر روی صفحات مشبک مسی^{۱۸} قرار گرفتند. سپس رنگ‌آمیزی نمونه‌ها با استات اورانیوم 1% به مدت ۲۰ دقیقه و یا سیترات سرب 2% به مدت ۶ دقیقه انجام گردید و در نهایت نمونه‌ها جهت بررسی فراساختار سلولی توسط میکروسکوپ TEM (LEO 912 AB, Zeiss, Germany) مشاهده و عکس‌برداری صورت گرفت (۱۹، ۲۰).

سنجش میزان تجمع عنصر کبالت با دستگاه اسپکترومتری نشری پلاسمای جفت شده القایی (ICP-OES)^{۱۹}

برای سنجش میزان کبالت در برگ، ابتدا خاکستر تر گیاهی تهیه شد. بدین منظور نمونه‌های برگ تازه در آون 70°C (UN30, Memmert GmbH, Germany) به مدت ۴۸ ساعت خشک شد و با آسیاب برقی (MM400, Retsch, Germany) پودر شد، سپس به ارلن‌های حاوی 0.5 گرم از پودر تهیه شده، ۶ میلی‌لیتر اسیدنیتریک غلیظ افزوده شد و درب ارلن‌ها بسته شد تا عمل هضم بافت به مدت ۲۴ ساعت انجام شود. سپس به ارلن‌ها برای هضم بهتر، ۴ میلی‌لیتر مخلوطی از آب اکسیژنه و اسیدنیتریک به نسبت ۴:۱ اضافه کرده و سپس جهت هضم کامل بافت‌ها، بر روی اجاق برقی به مدت ۴ تا ۵ ساعت قرار داده شد تا بخارات قهوه‌ای رنگ ازت به‌طور کامل خارج شود. تمام مراحل زیر هود انجام گرفت. پس از خارج شدن کامل بخارات اسیدی، محلول بی‌رنگی به‌دست آمد. در

¹⁶ Ultramicrotome

¹⁷ Toluidine blue stain

¹⁸ Copper grids

¹⁹ Inductively coupled plasma optical emission spectrometer

اکسیدکبالت بر روی پایه مخصوص دستگاه با چسپ کربنی چسبانده شد و سپس با دستگاه Sputter Coating (CC7650, England) به مدت ۱۰۰ تا ۱۵۰ ثانیه با 20mA پوشش‌دهی^{۱۴} با طلا انجام شد و سپس آنالیز عنصری نانوذرات اکسیدکبالت به وسیله دستگاه EDX (SAMx, Germany) سنجش شد.

تهیه بذر، کاشت و اعمال تیمار

جهت مطالعه اثر نانوذرات اکسیدکبالت بر ویژگی‌های ساختاری و فراساختاری برگ گیاه کلزا، پژوهشی در شرایط گلخانه‌ای کنترل شده (دما $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ، رطوبت نسبی 35% ، نور با شدت 10000 لوکس، فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) به صورت یک طرح کاملاً تصادفی در دو تیمار (۰ و 4000 میکروگرم بر میلی-لیتر) و ۴ تکرار انجام شد. بذر گیاه کلزا رقم زرفام از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی (مشهد) تهیه شد. گلدان‌های پلاستیکی ۲ کیلویی (گلدان‌هایی با قطر 17 سانتی‌متر و ارتفاع 15 سانتی‌متر) با خاک زراعی مناسب (مخلوطی از 64% شن، 26% سیلت و 10% رس) پر شدند. هر تیمار شامل ۴ گلدان و هر گلدان حاوی ۵ عدد بذر کلزا بود. دو هفته پس از کاشت، اسپری برگی تیمار نانوذرات به مدت ۵ هفته (به صورت هفتگی) انجام شد. طول دوره آزمایش ۵۰ روز بود. پس از اتمام دوره تیمار، طول و عرض برگ با خط‌کش و هم-چنین سطح برگ با استفاده از کاغذ شطرنجی اندازه‌گیری شد.

آماده‌سازی نمونه برای مطالعه با میکروسکوپ‌های نوری و الکترونی گذاره (TEM)^{۱۵}

جهت بررسی‌های ساختاری و فراساختاری، از برگ گیاه شاهد و برگ تیمار 4000 میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات اکسیدکبالت، ابتدا نمونه‌های برگ تازه (۱ میلی-متر مربع) با گلو تار آلدئید 6% در بافر کاکودیلات سدیم 0.1 مولار با 7.5 pH به مدت ۶ ساعت در دمای 4°C تثبیت شدند و سپس با تترا اکسید اسمیوم 1% به مدت ۲ ساعت در دمای 4°C ، در غلظت‌های مختلف الکل (30 ، 50 ، 70 و 100 درصد)، آبگیری شده و سپس از نسبت-

¹⁴ Coating

¹⁵ Transmission electron microscopy

عنصری جهت سنجش عنصر کبالت به وسیله دستگاه EDX (SAMx, Germany) سنجش شد.

آنالیز آماری

این پژوهش به صورت یک طرح کاملاً تصادفی در دو تیمار و چهار تکرار انجام شد. برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از نرم‌افزار SPSS v.26 استفاده شد و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون Independent samples t-test انجام شد و سپس نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم شد. ارزش معنی‌داری کم‌تر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج خصوصیات نانوذرات Co_3O_4

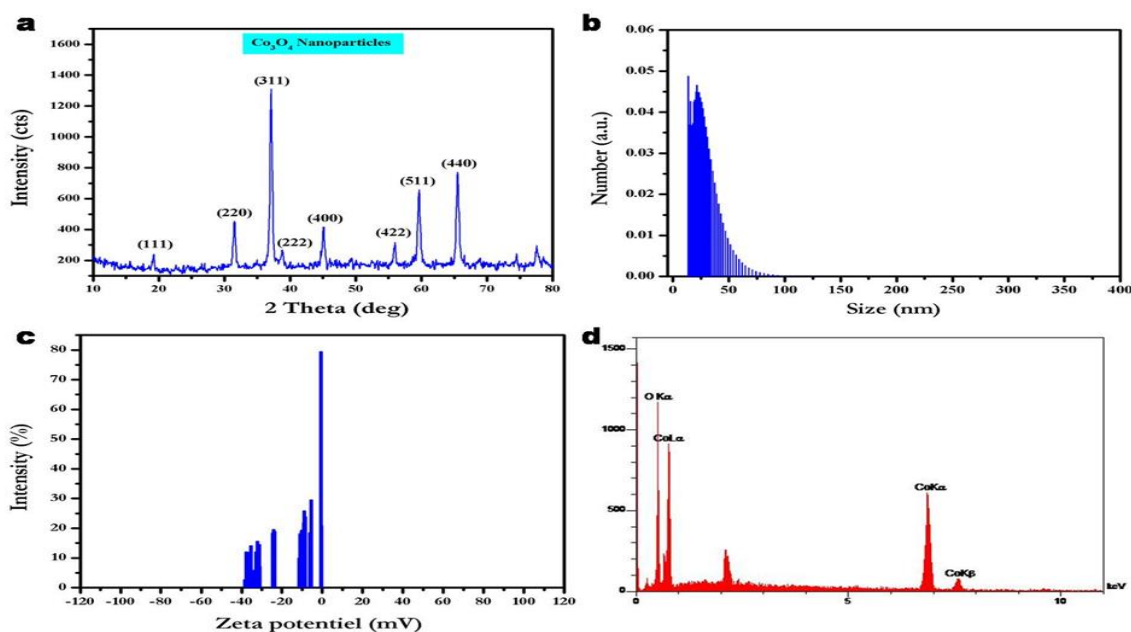
ساختار نانوذرات با استفاده از دستگاه XRD بین زاویه 10° تا 80° تعیین گردید. پیک‌های مشاهده شده در زوایای $19/25^\circ$ ، $31/54^\circ$ ، $37/09^\circ$ ، $38/81^\circ$ ، $45/07^\circ$ ، $56/01^\circ$ و $59/61^\circ$ به ترتیب مربوط به پراش از صفحات (۱۱۱)، (۲۲۰)، (۳۱۱)، (۲۲۲)، (۴۰۰)، (۴۲۲)، (۵۱۱) و (۴۴۰) مطابق با کارت استاندارد JCPDS file No. 01-074-2120 مربوط به نانوذرات Co_3O_4 با ساختار فازی مکعبی خالص بودند. همچنین نانوذرات اکسید کبالت تک‌فاز بودند و فاز فرعی و جزئی در این نانوذرات مشاهده نشد (شکل ۱a).

انتها ارلن‌ها را از روی اجاق برقی برداشته و پس از سرد شدن با استفاده از آب دیونیزه، حجم اندک محلول باقیمانده به حجم ۲۵ میلی‌لیتر رسانده شد و بدین ترتیب خاکستر تر به دست آمد. در طی مراحل انجام شده، کربن و نیتروژن در اثر حرارت زیاد به ترتیب به صورت گازهای دی اکسید کربن و نیتريت از محیط بافت خارج می‌گردند و باقی‌مانده محلول، عناصر معدنی گیاه را تشکیل می‌دهند. میزان عنصر کبالت در محلول به دست آمده با استفاده از دستگاه ICP-OES مدل ARCOS,76004555 SPECTRO با دقت بسیار بالا سنجش شد (۲۱).

آنالیز سنجش عنصری EDX جهت سنجش عنصر

کبالت در نمونه برگ شاهد و تیمار نانوذرات Co_3O_4

ابتدا مقداری نمونه تازه برگ شاهد و تیمار نانوذرات Co_3O_4 (۴۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) را در آون (UN30, Memmert GmbH, Germany) در دمای 70°C به مدت ۴۸ ساعت قرار داده تا خشک شود و سپس توسط آسیاب برقی (MM400, Retsch, Germany) پودر شد. سپس جهت آماده‌سازی نمونه برای آنالیز EDX، ۰/۰۰۱ گرم پودر خشک شده برگ نمونه شاهد و تیمار نانوذرات Co_3O_4 بر روی پایه مخصوص دستگاه با چسپ کربنی چسبانده شد و سپس با دستگاه Sputter Coating (CC7650, England) به مدت ۱۰۰ تا ۱۵۰ ثانیه با 20mA پوشش‌دهی با طلا انجام شد و سپس آنالیز



شکل ۱: آنالیز خصوصیات XRD (a)، قطر هیدرودینامیکی با استفاده از تکنیک DLS براساس تعداد (b)، پتانسیل زتا (c) و EDX (d) نانوذرات اکسیدکبالت (Co_3O_4 NPs)

۴۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به ترتیب ۵۰/۹۸، ۳۶/۵۸ و ۲۰/۹۵ درصد نسبت به شاهد کاهش یافت (شکل ۳).

تاثیر نانوذرات اکسید کبالت بر ساختار برگ گیاه کلزا

در این مطالعه، ساختار برگ کلزا در گیاه شاهد و گیاه تحت تیمار ۴۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با تهیه برش‌های نیمه نازک از برگ‌ها و رنگ‌آمیزی با آبی تولوئیدن و مشاهده با میکروسکوپ نوری بررسی شد (شکل ۴).

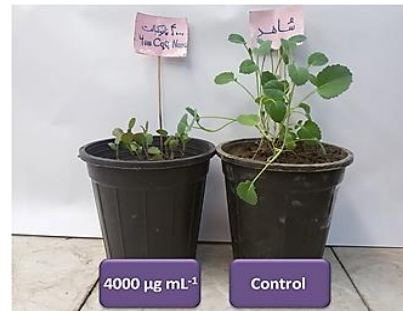
بر طبق نتایج تحقیق حاضر، ضخامت پهنک برگ تحت تیمار نانوذرات اکسید کبالت نسبت به ضخامت برگ شاهد افزایش یافت به طوری که ضخامت پهنک برگ از ۵۰۰ میکرومتر در نمونه شاهد به ۵۶۶/۶۶ میکرومتر در نمونه تحت تیمار نانوذرات رسید (شکل ۴a-b). هم‌چنین کاهش تعداد کلروپلاست‌ها در بافت مزوفیل برگ تحت تیمار نانوذرات نسبت به برگ شاهد مشاهده شد (شکل ۴e-f). علاوه بر این عدم تغییر ضخامت پارانشیم نردبانی، افزایش ضخامت پارانشیم اسفنجی و کاهش ضخامت دستجات آوندی در نمونه تحت تیمار نانوذرات نسبت به شاهد مشاهده شد (شکل ۴a-d).

قطر هیدرودینامیک^{۲۰} نانوذرات اکسید کبالت با استفاده از DLS و براساس تعداد تعیین شد که ۱۸/۶۷ نانومتر بود. نتایج DLS نشان داد که متوسط سایز قطر هیدرودینامیک نانوذرات اکسیدکبالت ۴۴/۵۹ نانومتر بود و شاخص پراکندگی آن برابر با ۰/۱۷۶ بود (شکل ۱b). هم‌چنین پتانسیل زتای نانوذرات اکسیدکبالت در pH ۶/۳۰ برابر با ۲۱/۳۷- میلی‌ولت بود (شکل ۱c). علاوه بر این در آنالیز عنصری EDX ذرات اکسیدکبالت، همه ذرات شناسایی شده شامل کبالت و اکسیژن بودند (شکل ۱d).

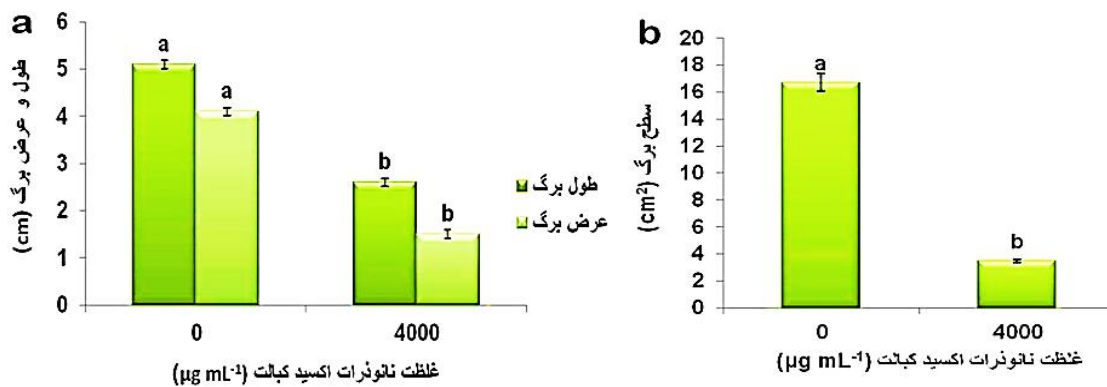
تاثیر نانوذرات اکسید کبالت بر رشد برگ شامل طول، عرض و سطح برگ گیاه کلزا

در شکل ۲، تاثیر غلظت‌های نانوذرات اکسید کبالت (۰ و ۴۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بر رشد برگ گیاهان کلزا در کشت گلدانی مشاهده شد. نتایج نشان داد که نانوذرات Co_3O_4 باعث کاهش معنی‌داری در رشد برگ شامل طول، عرض و سطح برگ کلزا شد (شکل ۳). طول، عرض و سطح برگ مربوط به تیمار نانوذرات Co_3O_4

²⁰ Hydrodynamic diameter



شکل ۲: تاثیر غلظت‌های نانوذرات اکسید کبالت (۰ و ۴۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بر رشد برگ گیاهان کلزا در کشت گلدانی



شکل ۳: تاثیر غلظت‌های نانوذرات اکسید کبالت (۰ و ۴۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بر رشد برگ شامل طول، عرض (a) و سطح (b) برگ گیاه کلزا در هر ستون حروف مشترک نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح $P \leq 0.05$ است.

نشاسته (نشاسته‌ای شدن) در کلروپلاست‌ها (شکل ۱-۶j) بود.

تاثیر نانوذرات اکسید کبالت بر میزان تجمع کبالت برگ گیاه کلزا

نتایج نشان داد که نانوذرات اکسید کبالت بر میزان تجمع کبالت برگ از لحاظ آماری افزایش معنی‌دار قابل توجهی را نشان داد (شکل ۷). میزان کبالت مربوط به تیمار ۴۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات اکسید کبالت، ۸۸۹/۱۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن خشک بود که نسبت به شاهد ۳۷/۹۱ برابر افزایش یافت و میزان عنصر کبالت در شاهد ۲۳/۴۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن خشک بود.

تاثیر نانوذرات اکسید کبالت بر فراساختار برگ گیاه کلزا

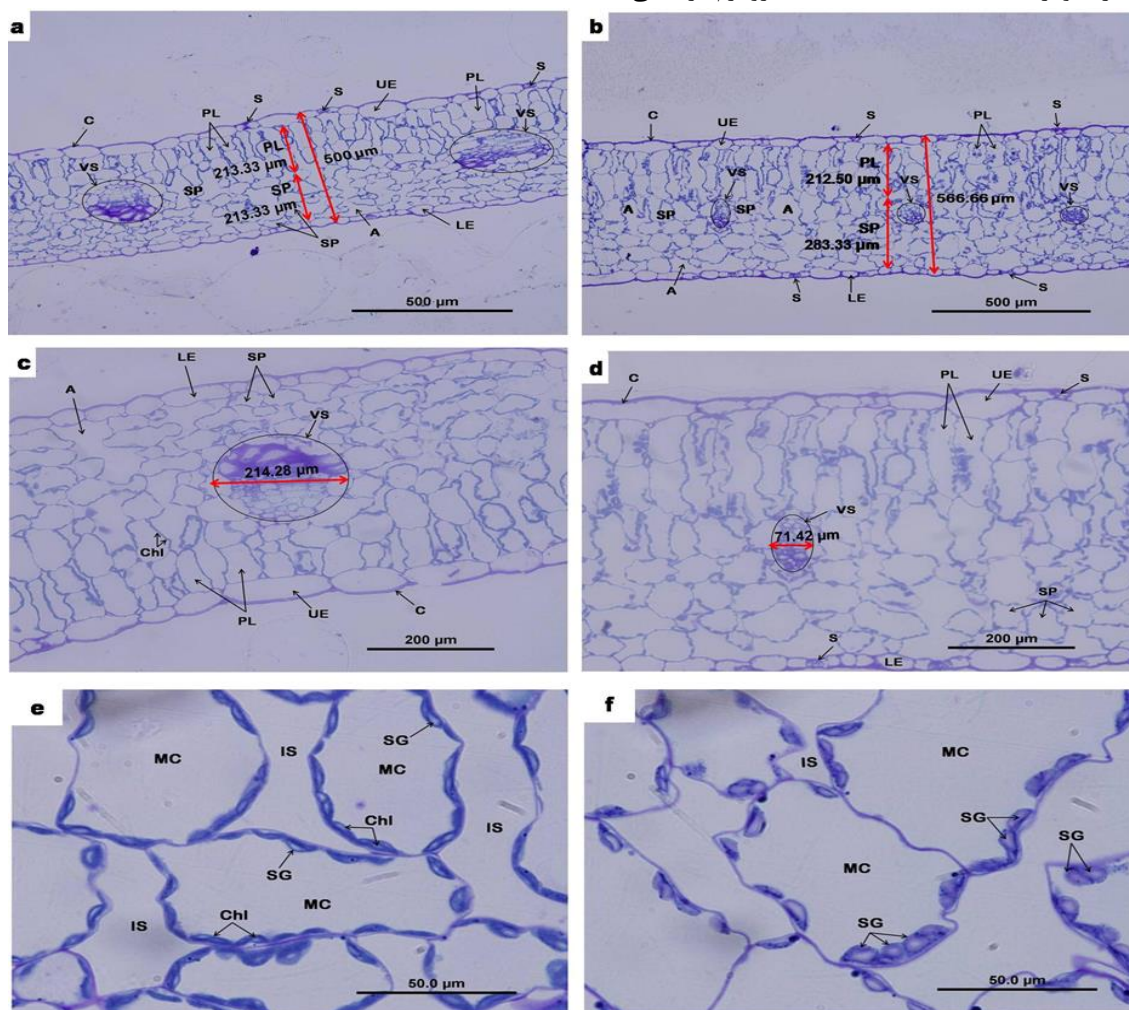
تاثیر نانوذرات اکسید کبالت بر فراساختار برگ گیاه کلزا توسط مطالعه ریزنگاره‌های TEM^{۲۱} حاصل از سلول‌های مزوفیل برگ گیاه شاهد و برگ تحت تیمار نانوذرات (۴۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بررسی شد (شکل‌های ۵ و ۶). نتایج حاصل از تغییرات فراساختاری سلول‌های مزوفیلی برگ گیاه کلزا تحت تأثیر تیمار نانوذرات در مقایسه با شاهد شامل کاهش تعداد کلروپلاست‌ها و متورم شدن آن‌ها (شکل ۵d-f)، تجمع و رسوب نانوذرات در واکوئل و دیواره سلولی (شکل ۶e-k)، مشاهده اجسام پروتئینی^{۲۲} (شکل ۶e-f)، افزایش اندازه پلاستوگلوبول‌ها در کلروپلاست‌ها (شکل ۶e-l) و افزایش اندازه دانه‌های

²¹ Micrograph

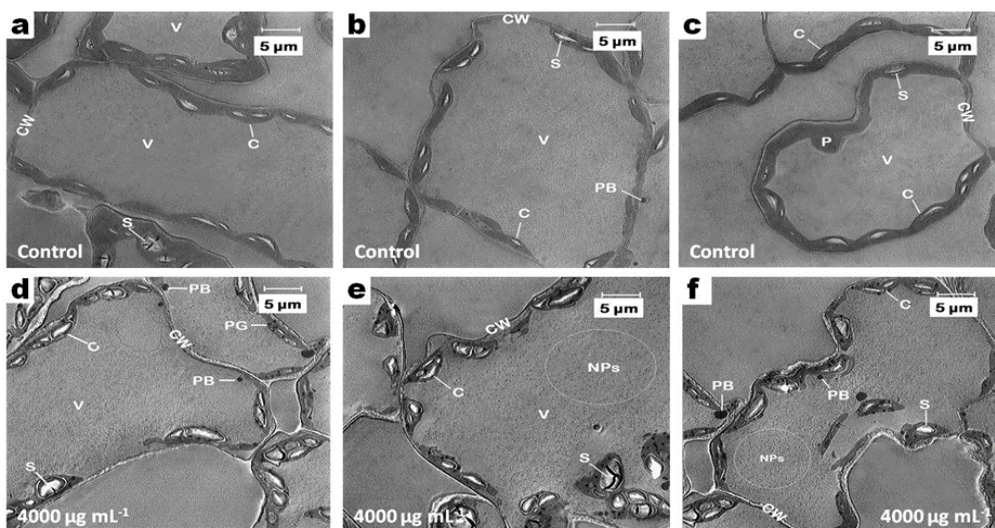
²² Protein body

لیتر) سنجش شد (شکل ۸). در شکل ۸، فلش‌های آبی رنگ بیانگر پیک‌های کبالت ($CoK\alpha$, $CoK\beta$, $CoL\alpha$) می‌باشند که تمامی پیک‌های عنصر کبالت در نمونه برگ تیمار نانوذرات اکسید کبالت نسبت به نمونه شاهد افزایش بسیار قابل توجهی را نشان دادند.

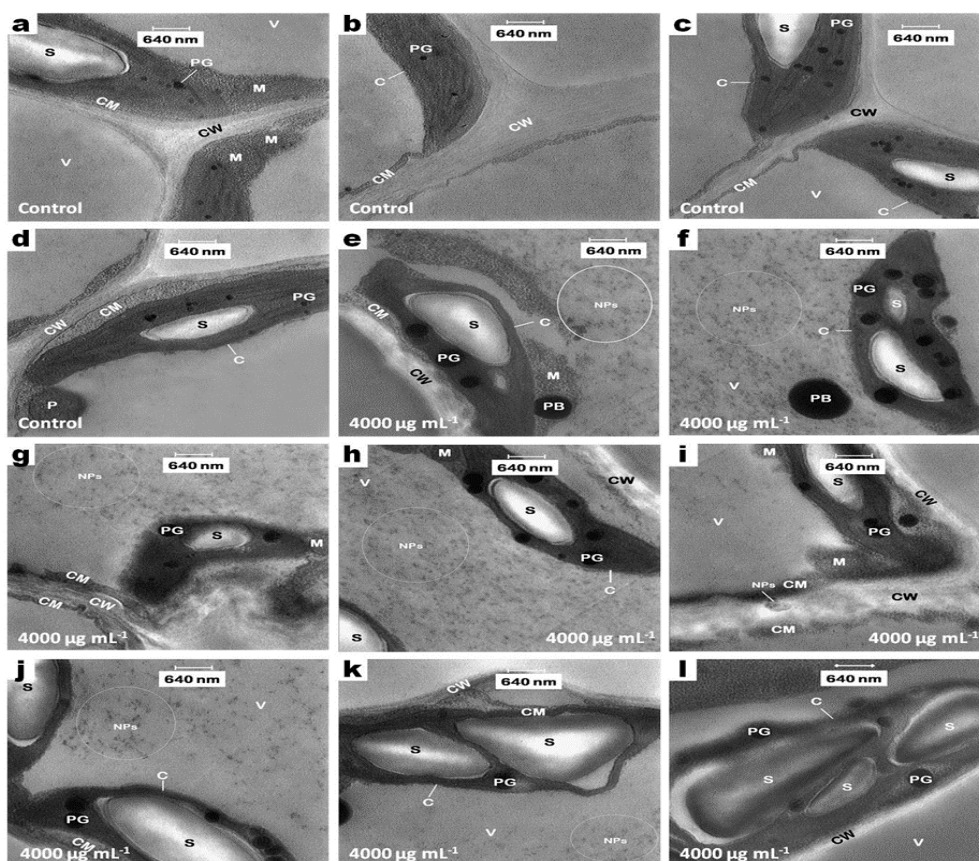
آنالیز سنجش عنصری EDX جهت سنجش عنصر کبالت در نمونه برگ شاهد و تیمار نانوذرات اکسید کبالت
آنالیز EDX نمونه پودر خشک شده برگ‌های شاهد و تیمار نانوذرات اکسید کبالت (۴۰۰۰ میکروگرم بر میلی-



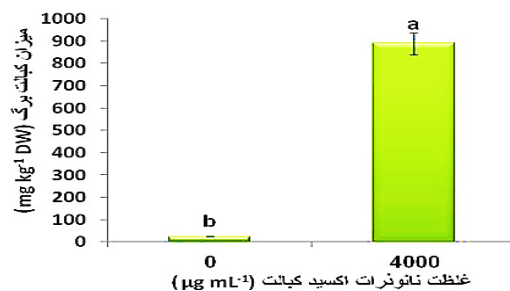
شکل ۴: برش عرضی پهنک برگ گیاه کلزا در نمونه شاهد (a,c,e) و نمونه تحت تیمار نانوذرات اکسید کبالت (۴۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) (b,d,f) به ترتیب با بزرگ‌نمایی‌های ۵۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ میکرومتر (MC): سلول مزوفیل، IS: فضای بین سلولی، SG: دانه نشاسته، Chl: کلروپلاست، C: کوتیکول، LE: اپیدرم پایینی، UE: اپیدرم بالایی، A: حفره هوا، S: روزنه، PL: پارانشیم نردبانی، SP: پارانشیم اسفنجی، VS: دسته آوندی)



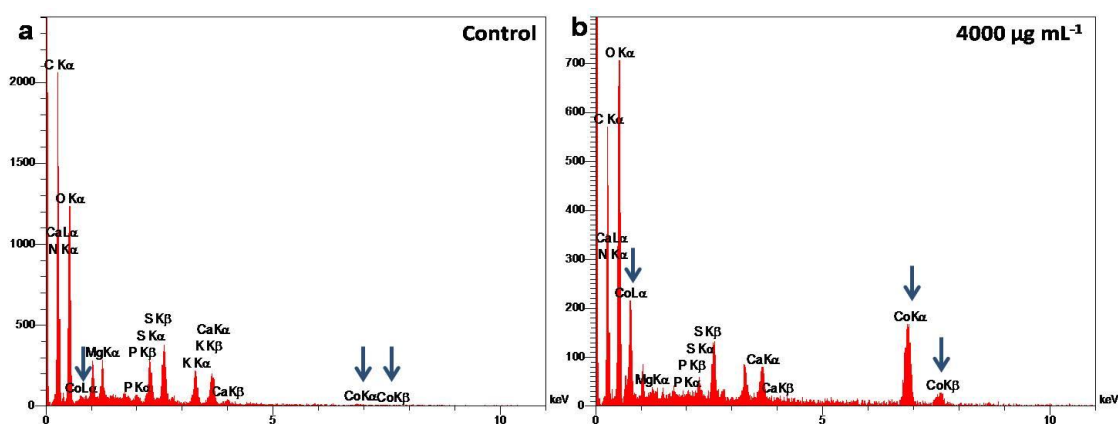
شکل ۵: ریزنگاره‌های TEM سلول‌های مزوفیلی برگ شاهد (a-c) و برگ تحت تیمار ۴۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات اکسیدکبالت (d-f) در گیاه کلزا با بزرگ‌نمایی ۵ میکرومتر (C: کلروپلاست، S: دانه نشاسته، PB: جسم پروتئینی، CW: دیواره سلولی، V: واکوئل، P: پراکسیزوم، PG: پلاستوگلیول، NPs: نانوذرات)



شکل ۶: ریزنگاره‌های TEM سلول‌های مزوفیلی برگ شاهد (a-d) و برگ تحت تیمار ۴۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات اکسیدکبالت (e-l) در گیاه کلزا با بزرگ‌نمایی ۶۴۰ نانومتر (C: کلروپلاست، M: میتوکندری، S: دانه نشاسته، PB: جسم پروتئینی، CW: دیواره سلولی، V: واکوئل، P: پراکسیزوم، PG: پلاستوگلیول، CM: غشای سلولی، NPs: نانوذرات)



شکل ۷ - تاثیر غلظت‌های نانوذرات اکسید کبالت (۰ و ۴۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بر میزان کبالت برگ گیاه کلزا. در هر ستون حروف مشترک نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح $P \leq 0.05$ است.



شکل ۸ - آنالیز EDX نمونه برگ شاهد (a) و برگ تیمار نانوذرات اکسید کبالت (۴۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) (b)، فلش‌های آبی رنگ بیانگر پیک‌های کبالت ($CoK\beta$, $CoK\alpha$, $CoL\alpha$) می‌باشند.

بحث

تحقیق حاضر، احتمالاً کاهش طول، عرض و سطح برگ و همچنین کاهش تعداد کلروپلاست‌ها می‌تواند باعث اختلال و کاهش فتوسنتز شود. در تحقیق حاضر، تغییرات ساختاری سلول‌های مزوفیلی برگ گیاه کلزا تحت تاثیر تیمار نانوذرات اکسید کبالت (۴۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در مقایسه با شاهد شامل کاهش تعداد کلروپلاست‌ها در بافت مزوفیل برگ، افزایش ضخامت پهنک برگ، عدم تغییر ضخامت پارانشیم نردبانی، افزایش ضخامت پارانشیم اسفنجی و کاهش ضخامت دستجات آوندی مشاهده شد. تغییرات محیطی منجر به تغییرات آناتومیکی در سلول‌ها و بافت‌های برگ می‌شوند (۱۹). گزارشات مختلفی در رابطه با تاثیر فلزات سنگین و نانوذرات بر آناتومی برگ گیاهان در دسترس است. در گزارشی آناتومی گیاه لفل (*Capsicum annuum*) تحت تاثیر نانوذرات آهن بررسی گردید. نتایج نشان داد که تیمار ۵۰

افزایش کاربرد نانوتکنولوژی و تولید نانوذرات مختلف باعث آلودگی محیط زیست می‌شوند بنابراین استفاده روز افزون نانومواد سبب ورود مقادیر بالای آن به خاک، اتمسفر و آب و اثر منفی بر گیاهان زراعی شده است (۳،۴). مطالعات گذشته نشان می‌دهند که تیمار با نانوذرات اکسید فلزی سبب تجمع آن در بافت‌های مختلف گونه‌های گیاهی می‌شود که با روش‌های مختلفی از جمله TEM، EDX، ICP-MS، ICP-OES، تکنیک‌های ردیابی پرتو و غیره قابل بررسی است (۲۲).

نتایج تحقیق حاضر، کاهش طول، عرض و سطح برگ در گیاه کلزا تحت تیمار نانوذرات اکسید کبالت را نشان داد. هم‌سو با نتایج تحقیق حاضر، کاهش سطح برگ در گیاه جوی تحت غلظت‌های ۵۰۰ تا ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذرات اکسید سریوم مشاهده شد (۲۳). در

میکرومولار نانوذرات آهن باعث افزایش ضخامت پهنک برگ و بافت مزوفیل شد (۴).

در تحقیقی بر روی گیاه کلزا تحت تاثیر نانوذرات اکسید روی، مطالعات آناتومی نشان داد که ضخامت پهنک برگ و همچنین تعداد کلروپلاست‌ها کاهش یافت. علاوه بر این سلول‌های بافت مزوفیل، اپیدرم و دستجات آوندی تغییر شکل یافتند و فضای بین سلولی در بافت مزوفیل نسبت به شاهد کاهش نشان داد و به‌طور کلی در شرایط تیمار، سلول‌های اپیدرم نسبت به شاهد بزرگ‌تر بودند. به نظر می‌رسد نانو ذرات می‌توانند با تاثیر بر مسیرهای جذب آب و یون‌ها (مسیر آپوپلاستی و سیمپلاستی) بر روی جذب آب و سایر یون‌ها تاثیرگذار باشند که البته بسته به اندازه این ذرات دارد و تغییرات اندازه واکوئل‌ها و اندامک‌های دیگر برای مقابله با این تاثیرات است (۱۹).

گزارش شده است که اپیدرم برگ، بافت‌های نگره دارنده و آوندهای برگ مکان‌های ذخیره فلزات می‌باشند و مکان ذخیره فلزات در سلول‌ها نیز واکوئل‌ها می‌باشند. علاوه بر این فضاهای بین سلولی و بافت کلانشیم، از مکان‌های عمده تجمع فلزات سنگین و نانوذرات در گیاهان می‌باشند (۲۴). همچنین در گزارشی دیگر برخی تغییرات آناتومیکی از جمله افزایش ضخامت پهنک برگ و کاهش ضخامت دستجات آوندی در برگ گیاه صنوبر تحت غلظت بالای Zn مشاهده شد (۲۵) که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. در نتایج تحقیق حاضر، افزایش ضخامت پهنک برگ که به دلیل افزایش ضخامت بافت پارانشیم اسفنجی بوده است، احتمالاً تاثیر چندانی بر فتوسنتز نداشته است چون مزوفیل اسفنجی نقش کمی بر فتوسنتز داشته و مزوفیل نردبانی نقش اصلی در فتوسنتز را دارد (۲۶). همچنین در تحقیق حاضر، کاهش تعداد کلروپلاست‌ها و متورم شدن آن‌ها نیز احتمالاً باعث اختلال و کاهش فتوسنتز می‌شود (۲۷). علاوه بر این در تحقیق حاضر، کاهش ضخامت دستجات آوندی احتمالاً منجر به کاهش انتقال آب و عناصر معدنی در گیاه و در نتیجه کاهش فتوسنتز و رشد می‌شود (۱۹).

در مطالعه‌ای دیگر مشخص گردید که غلظت بالای نانو ذرات اکسیدروی، سبب به هم ریختگی و بی‌نظمی در بافت‌های ریشه لوبیا شد و همچنین گسترش سیستم واکوئلی در سلول‌های پارانشیم پوست و فشرده شدن استوانه آوندی نیز مشاهده گردید (۲۸). مشابه با نتایج

تحقیق حاضر، در مطالعه‌ای دیگر در غلظت ۱۰۰ میکرو-گرم بر میلی‌لیتر نانو ذرات نقره، ضخامت بافت پارانشیم اسفنجی برگ افزایش یافت (۲۹). نتایج بررسی‌ها نشان می‌دهد که تاثیر نانوذرات بر روی هورمون‌های رشد می‌تواند در شکل‌گیری آوندهای آبکش و چوب تاثیرگذار باشد (۵). علاوه بر این به گفته برخی محققان تاثیر نانوذرات بر دیواره سلولی نیز سبب تغییر شکل سلول می‌شود (۳۰). همچنین پیشنهاد شده است که نانوذرات اکسیدفلزی می‌توانند موجب پراکسیداسیون لیپید و در نتیجه آسیب غشای سلول شوند (۱۳). در گزارشی بر روی گیاه جوی دوسر (*Avena sativa*) تحت تاثیر تیمار نانوذرات سیلیس، نتایج نشان داده که ضخامت دیواره به علت تجمع نانوذرات افزایش یافته است (۳۱).

در مطالعه‌ای دیگر تغییرات ساختار برگ گیاه گل راعی (*Hypericum perforatum*) تحت تاثیر تنش سرب بررسی شد. نتایج حاصل از مطالعات آناتومی نشان داد که سمیت سرب، بافت‌های اپیدرم، مزوفیل، دستجات آوندی و کلانشیم برگ را تحت تاثیر قرار داد. به طوری که با افزایش غلظت سرب، ضخامت پهنک برگ افزایش یافت، اما اندازه سلول‌های اپیدرم فوقانی و تحتانی کاهش یافت، همچنین با افزایش غلظت سرب ضخامت مزوفیل نردبانی کاهش و مزوفیل اسفنجی افزایش یافت (۳۲).

همچنین گزارش شده است که تیمار با فلزات سنگین می‌تواند منجر به ظهور علائمی شبیه به علائم تنش خشکی از قبیل افزایش ضخامت پهنک برگ و مزوفیل نردبانی، افزایش اندازه سلول‌های اپیدرم فوقانی، افزایش تعداد روزنه‌ها و کاهش قطر دهانه آن‌ها در ساختار برگ شود. فراوان بودن بافت مزوفیل نردبانی، برگ را در مقابل تنش خشکی ثانویه حاصل از تنش فلزات سنگین محافظت می‌کند، همچنین منجر به افزایش جذب سطحی CO₂ می‌گردد (۳۳). همچنین در مطالعه‌ای بر روی بادام زمینی گزارش شده است که با افزایش غلظت کادمیوم، ضخامت پهنک برگ و مزوفیل نردبانی افزایش یافت (۳۴).

همچنین در گیاه بابونه آلمانی (*Matricaria chamomilla*)، افزایش غلظت سرب تا ۱۸۰ میکرومولار سبب کاهش در ضخامت اپیدرم، ضخامت آوند چوب و آبکش برگ، ضخامت پهنک برگ و افزایش در ضخامت کوتیکول برگ شد (۳۳). تغییرات در شکل و اندازه سلول‌ها و تمایز آن‌ها در مراحل مختلف رشد گیاه، می

کلروپلاست و تغییر شکل کلروپلاست‌ها مشاهده شد (۲۰).

در گزارشی دیگر، در برگ گیاه خرفه تحت تیمار نانو ذرات ZnO، متورم شدن کلروپلاست‌ها، افزایش تعداد و اندازه دانه‌های نشاسته، به‌هم ریختگی تیلاکوئیدها، از هم پاشیدگی غشای سلولی و افزایش فضای آپوپلاستی مشاهده شد (۳۶). در پژوهشی دیگر در گیاه آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) تحت تیمار با نانوذرات نقره (۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، تجمع نانوذرات در فضاهای بین و درون سلولی در برگ‌ها، کاهش اندازه سلول‌های مزوفیلی، پراکنده شدن و بی‌نظمی در کلروپلاست‌ها، کاهش تعداد کلروپلاست‌ها، افزایش تعداد پلاستوگلوبول‌ها و به‌هم ریختگی ساختار غشای تیلاکوئیدی مشاهده شد (۳۷).

Li و همکاران (۳۸) بیان کردند که در گیاه سویا تحت تیمار با نانوذرات اکسید کروم (۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، نانوذرات باعث آسیب و تخریب تیلاکوئیدها و گرانه‌های کلروپلاست‌ها، افزایش فضای واکوئلی، افزایش تعداد دانه‌های نشاسته و در نتیجه کاهش فتوسنتز و آسیب‌های غیرقابل برگشت به گیاه شد. در مطالعه‌ای در گیاهان *Brassica juncea*، *Festuca rubra* و *Medicago sativa* تحت تیمار با غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات نقره، تصاویر TEM، رسوب نانوذرات را در دیواره سلولی، سیتوپلاسم و استرومای کلروپلاست برگ‌ها نشان داد (۳۹). در تحقیقی دیگر در برگ گیاه کرچک تحت تیمار نانوذرات اکسید روی، تجمع نانوذرات، از هم پاشیدگی دیواره و غشای سلولی و هم‌چنین بدشکلی و کاهش تعداد کلروپلاست‌ها مشاهده شد (۴۰). هم‌چنین در پژوهشی دیگر در گیاه جوی تحت تیمار ۱۰۰۰ میکرو-مولار نانوذرات نقره برای مدت سه هفته، در تصاویر TEM مربوط به برگ گیاهان تحت تیمار، کاهش تعداد کلروپلاست‌ها، بی‌نظمی در تیلاکوئیدها، افزایش تعداد پلاستوگلوبول‌ها، متراکم شدن کروماتین هسته و تجزیه میتوکندری مشاهده شد (۴۱).

مشابه با نتایج تحقیق حاضر، در گزارشی بر روی گیاهچه‌های تنباکو تحت تیمار با نانوذرات نقره (۱۰۰ میکرومولار)، رسوب نانوذرات در سلول‌های مزوفیل برگ و هم‌چنین تغییرات فراساختاری در کلروپلاست‌ها از جمله کلروپلاست‌های متورم و افزایش تعداد پلاستوگلوبول‌ها

تواند به درک بهتر تاثیر نانوذرات بر گیاه کمک کند (۵). هم‌چنین در گیاه خردل (*Brassica juncea*) تیمار شده با غلظت‌های بالای فلز روی، کاهش تعداد سلول‌های مزوفیل نردبانی و اپیدرمی، به‌هم ریختگی بافت پارانشیم اسفنجی و نردبانی، چروکیدگی سلول‌های اپیدرمی برگ، تغییر شکل سلولی و کاهش فضاهای بین سلولی و رسوب توده‌ای فلزات در ریشه‌ها مشاهده شد (۳۵).

در تحقیق حاضر، تغییرات فراساختاری سلول‌های مزوفیلی برگ گیاه کلزا تحت تاثیر تیمار نانوذرات اکسید کبالت (۴۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در مقایسه با شاهد شامل کاهش تعداد کلروپلاست‌ها و متورم شدن آن‌ها، تجمع و رسوب نانوذرات در واکوئل و دیواره سلولی، مشاهده اجسام پروتئینی، افزایش اندازه پلاستوگلوبول‌ها^{۲۳} و هم‌چنین افزایش اندازه دانه‌های نشاسته^{۲۴} (نشاسته‌ای شدن) در کلروپلاست‌ها مشاهده شد.

مطالعات مختلفی بر روی فراساختار برگ گیاهان تحت تیمار نانوذرات و فلزات سنگین انجام شده است. در پژوهشی تحت تاثیر نانوذرات اکسید کبالت (۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بر روی بادمجان، رسوب نانوذرات اکسید کبالت در اندامک‌ها دیده شد و هم‌چنین غشاهای درونی میتوکندری و پراکسی‌زوم‌ها تخریب شدند. در کنار این تغییرات، ساختار غشا هم در نتیجه تولید گونه‌های اکسیژن‌واکنش‌گر (ROS)^{۲۵} دچار آسیب شد و مرگ سلولی نیز در نتیجه آسیب به ساختار DNA مشاهده شد (۱۳). هم‌چنین بررسی فراساختار گیاه کلزا تحت تاثیر نانوذرات اکسید روی نشان داد که در مزوفیل برگ، شکل کلروپلاست‌ها تغییر کردند و دانه‌های نشاسته به‌وضوح بزرگ‌تر شدند و تعدادشان افزایش یافت. هم‌چنین تجمعاتی از نانوذرات در اطراف دیواره سلولی مشاهده شد. علاوه بر این تخریب واکوئل و غشای سلولی و نیز کاهش اندازه میتوکندری در برخی از سلول‌ها مشاهده شد (۱۹). هم‌چنین در بررسی فراساختار برگ گیاه کرچک (*Ricinus communis*) تحت تیمار نانولوله‌های کربنی چند دیواره، تجمع و رسوب نانولوله‌های کربنی چند دیواره در واکوئل و سیتوپلاسم، افزایش تعداد پلاستوگلوبول‌ها در استرومای

²³ Plastoglobules

²⁴ Starch grains

²⁵ Reactive oxygen species

اندامک‌هایی مانند کلروپلاست و میتوکندری شود (۱۹،۲۵).

در مطالعه حاضر تجمع نانوذرات اکسیدکبالت در دیواره سلولی و در واکوئل سلول‌های مزوفیلی برگ گیاهان کلزا مشاهده شد. یکی از راهکارهایی که گیاهان برای تحمل فلزات سنگین مورد استفاده قرار می‌دهند، به دام‌اندازی آن‌ها در جایگاه‌های ویژه‌ای از بافت‌های برگ می‌باشد. این جایگاه‌ها بسته به نوع فلز و گونه‌ی گیاهی متغیرند (۲۵). در تحقیق حاضر، تجمع کبالت به‌روش ICP-OES در برگ کلزای تحت تیمار با نانوذرات Co_3O_4 مشاهده شد. گزارشات کمی در مورد جذب برگ‌ی نانوذرات از طریق روش اسپری برگ‌ی وجود دارد. در این روش نانوذرات از طریق روزنه‌های هوایی^{۲۶} و آبی^{۲۷} برگ نفوذ کرده و به دیواره‌های سلولی پارانشیم نردبانی و آبکش برگ می‌رسند و در کل گیاه توزیع می‌شوند (۳،۴۴،۴۵). مشابه با نتایج تحقیق حاضر، جذب نانوذرات از طریق برگ در گیاه هندوانه و خیار گزارش شده است (۳،۴۴). هم‌چنین تجمع Cu در برگ گیاه کلم و کاهو اسپری شده با نانوذرات اکسید مس گزارش شده است (۴۵). در پژوهشی دیگر، López-Moreno و همکاران (۴۶)، تجمع کبالت و آهن را در گیاهان گوجه‌فرنگی در معرض نانوذرات $CoFe_2O_4$ گزارش کردند. علاوه بر این، محتوای کبالت در گندم تحت تیمار غلظت‌های ۵۰۰ تا ۸۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذرات کبالت-فريت افزایش یافت (۱۶).

هم‌چنین در مطالعه حاضر هم‌راستا با نتایج ICP-OES، نتایج آنالیز عنصری EDX نیز تجمع عنصر کبالت را در برگ گیاه کلزا تحت تیمار نانوذرات اکسید کبالت (۴۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تایید کرد. هم‌سو با نتایج تحقیق حاضر، در پژوهشی بر روی ریزجلبک *Haematococcus pluvialis* تحت تیمار نانوذرات اکسید روی، تجمع نانوذرات توسط آنالیزهای EDX و ICP-OES تایید شد (۴۷).

نتیجه‌گیری

در مجموع در تحقیق حاضر، تغییرات مورفولوژیکی از جمله کاهش طول، عرض و سطح برگ کلزا تحت تیمار نانوذرات اکسید کبالت مشاهده شد. هم‌چنین نتایج تجمع

مشاهده شد که این تغییرات منجر به کاهش فتوسنتز شدند (۲۷). در پژوهشی دیگر، نانوذرات اکسید آهن در غلظت ۲۰۰۰ میکرومول بر لیتر، منجر به تغییراتی در فراساختار برگ گیاه فلفل مانند کاهش ضخامت دیواره سلول‌های مزوفیل، کاهش تعداد کلروپلاست‌ها و تجزیه لاملای گرانا شدند (۴). هم‌چنین افزایش ضخامت دیواره سلول‌های مزوفیلی در برگ گیاه جوی دوسر، تحت تیمار ۱۰ میلی‌مول بر لیتر نانوذرات سیلیس مشاهده شد (۳۱).

در گیاه خردل، تیمار فلز سنگین Zn سبب کاهش فضای بین سلولی و تغییر شکل سلول شد. هم‌چنین اجسام پروتئینی نیز مشاهده گردید (۳۵). این اجسام پروتئینی در دانه، ریشه، ساقه، برگ و میوه یافت شده و جزء اجزای تجزیه پروتئینی در سیتوپلاسم می‌باشند (۴۲). بنابراین در تحقیق حاضر ممکن است وجود این اجسام پروتئینی در گیاه تحت تیمار نانوذرات به دلیل تجزیه پروتئین‌های سیتوزولی باشد که در اثر تنش تخریب شدند. هم‌چنین افزایش پلاستوگلوبولی در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی مشاهده شده که می‌تواند به‌عنوان علامت تنش در نظر گرفته شود (۱۹،۲۰،۲۵).

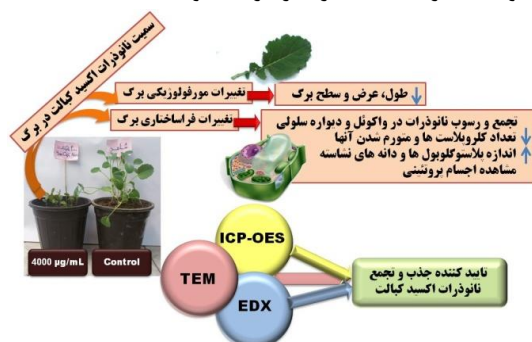
Todeschini و همکاران (۲۵) گزارش کردند که در برگ‌های صنوبر تحت تنش Zn، کلروپلاست‌ها کوچک‌تر از اندازه طبیعی بودند و به‌ازای هر سلول در بافت پارانشیم نردبانی، تعداد کلروپلاست‌ها کاهش یافت. مشابه با نتایج مطالعه حاضر، این محققین هم‌چنین گزارش کردند که Zn موجب القای افزایش در تعداد و اندازه پلاستوگلوبول‌ها شد. افزایش پلاستوگلوبول در کلروپلاست برگ‌ها یکی از پاسخ‌ها به تنش‌هایی از جمله فلزات سنگین و نانوذرات است. این تغییر، یکی از علائم عمده پیری نیز محسوب می‌شود. پیدایش واکوئل‌ها و از هم پاشیدگی اندامک‌ها مانند کلروپلاست و میتوکندری می‌تواند به‌عنوان نشانه‌ای از پیری القاشده پیشرفته در نظر گرفته شود (۱۹،۲۵).

Jiang و همکاران (۴۳) گزارش کردند که تحت تنش فلزات سنگین Zn و Cd، فراساختار و شکل کلروپلاست‌ها تغییر یافت و تعداد گرانا و تیلاکوئید در ذرت کاهش یافت. گزارش شده است که در گیاهان تحت تنش فلزات سنگین در غلظت‌های بیش‌تر از آستانه تحمل گیاه، انتظار می‌رود که به دلیل ناتوانی سیستم دفاعی گیاه جهت خنثی‌سازی مقادیر زیاد ROS، انباشت آن‌ها موجب آسیب‌رسانی به

²⁶ Stoma

²⁷ Hydathode

احتمالی نانوذرات اکسیدکبالت بر روی گیاهان زراعی دیگر و محیط زیست باید در نظر گرفته شود.



شکل ۹ - نمایی شماتیک از تحقیق حاضر

تقدیر و تشکر

از گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد و همچنین از کارشناسان محترم بخش میکروسکوپ الکترونی و دستگاه ICP-OES آزمایشگاه مرکزی دانشگاه فردوسی مشهد تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

- Saeidnia, S., Gohari, A.R., 2012. Importance of *Brassica napus* as a medicinal food plant. *Journal of Medicinal Plant Research*. 6(14): 2700-2703.
- Lin, L., Allemekinders, H., Dansby, A., Campbell, L., Durance-Tod, S., Berger, A., Jones, P.J., 2013. Evidence of health benefits of canola oil. *Nutrition Reviews*. 71(6): 370-385.
- Hong, J., Peralta-Videa, J.R., Rico, C., Sahi, S., Viveros, M.N., Bartonjo, J., Zhao, L., Gardea Torresdey, J.L., 2014. Evidence of translocation and physiological impacts of foliar applied CeO₂ nanoparticles on cucumber (*Cucumis sativus*) plants. *Environmental Science and Technology*. 48(8): 4376-4385.
- Yuan, J., Chen, Y., Li, H., Lu, J., Zhao, H., Liu, M., Nechitaylo, G.S., Glushchenko, N.N., 2018. New insights into the cellular responses to iron nanoparticles in *Capsicum annuum*. *Scientific Reports*. 8(1): 3228.
- Nhan, L.V., Ma, C., Rui, Y., Liu, S., Li, X., Xing, B., Liu, L., 2015. Phytotoxic mechanism of nanoparticles: destruction of chloroplasts and vascular bundles and alteration of nutrient absorption. *Scientific Reports*. 5: 11618.
- Bundschuh, M., Filser, J., Luderwald, S., Mckee, M. S., Metreveli, G., Schaumann, G.E., Schulz, R., Wagner, S., 2018. Nanoparticles in the environment: where do we come from? where do we go to? *Environmental Sciences Europe*. 30(6).
- Rem'edios, C., Ros'ario, F., Bastos, V., 2012. Environmental Nanoparticles Interactions with Plants: Morphological, Physiological, and Genotoxic Aspects. *Journal of Botany*. 226-233.
- Gál, J., Hursthouse, A., Tatner, P., Stewart, F., Welton, R., 2008. Cobalt and secondary poisoning in the terrestrial food chain: data review and research gaps to support risk assessment. *Environment International*. 34(6): 821-838.
- Sonia, T., Thukral, A.K., 2014. Effects of macro- and nano-cobalt oxide particles on barley seedlings and remediation of cobalt chloride toxicity using sodium hypochlorite. *International Journal of Plant & Soil Science*. 3(6): 751-762.
- Tizro, S., Baseri, H., 2017. Removal of cobalt ions from contaminated water using magnetite based nanocomposites: effects of various parameters on the removal efficiency. *Journal of Water and Environmental Nanotechnology*. 2(3): 174-185.
- Mahey, S., Kumar, R., Sharma, M., Kumar, V., Bhardwaj, R., 2020. A critical review on toxicity of cobalt and its bioremediation strategies. *SN Applied Sciences*. 2: 1279.
- Srivastava, N., 2015. Interaction of cobalt nanoparticles with plants: a cytogenetical aspect. *Journal of Experimental Nanoscience*. 10(10): 769-776.
- Faisal, M., Saquib, Q., Alatar, A.A., Al-Khedhairi, A.A., Ahmed, M., Ansari, S.M., Alwathnani, H.A., Dwivedi, S., Musarrat, J., Praveen, S., 2016. Cobalt

- oxide nanoparticles aggravate DNA damage and cell death in eggplant via mitochondrial swelling and NO signaling pathway. *Biological Research*. 49(20).
14. Kong, I.C., Ko, K.S., Koh, D.C., Chon, C.M., 2020. Comparative effects of particle sizes of cobalt nanoparticles to nine biological activities. *International journal of molecular sciences*. 21(18): 6767.
 15. Bouguerra, S., Gavina, A., Rasteiro, M.G., Rocha Santos, T.A.P., Ksibi, M., Pereira, R., 2019. Effects of cobalt oxide nanomaterial on plants and soil invertebrates at different levels of biological organization. *Journal of Soils and Sediments*. 19(7): 3018-3034.
 16. López-Luna, J., Camacho-Martínez, M.M., Solís Domínguez, F.A., González-Chávez, M.C., Martínez Vargas, S., Mijangos-Ricardez, O.F., Cuevas-Díaz, M.C., 2018. Toxicity assessment of cobalt ferrite nanoparticles on wheat plants. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. 81(14): 604-619.
 17. Wu, S.G., Huang, L., Head, J., Chen, D.R., Kong, I.C., Tang, Y.J., 2012. Phytotoxicity of metal oxide nanoparticles is related to both dissolved metals ions and adsorption of particles on seed surfaces. *Journal of Petroleum and Environmental Biotechnolog*. 3: 100-126.
 18. Jahani, M., Khavari-Nejad, R.A., Mahmoodzadeh, H., Saadatmand, S., 2020. Investigation of seed germination, early growth and physio-biochemical parameters of canola seedling exposed to Co₃O₄ engineered nanoparticles. *Journal of Chemical Health Risks*. doi: 10.22034/jchr.2020.1891185. 1092.
 19. Mousavi Kouhi, S.M., Lahouti, M., Ganjeali, A., Entezari, M.H., 2015a. Long-term exposure of rapeseed (*Brassica napus* L.) to ZnO nanoparticles: anatomical and ultrastructural responses. *Environmental Science and Pollution Research*. 22(14): 10733-10743.
 20. Fathi, Z., Khavari-Nejad, R.A., Mahmoodzadeh, H., Nejad-Sattari, T., 2018. Investigating of ultrastructure and histology leaf and root of castor seeds (*Ricinus communis* L.) under concentrations of multi-walled carbon nanotubes. *Developmental Biology*. 10(2): 1-10.
 21. Mousavi Kouhi, S.M., Lahouti, M., Ganjeali, A., Entezari, M.H., 2015b. Comparative effects of ZnO nanoparticles, ZnO bulk particles, and Zn²⁺ on *Brassica napus* after long-term exposure: changes in growth, biochemical compounds, antioxidant enzyme activities, and Zn bioaccumulation. *Water, Air, and Soil Pollution*. 226(11): 392.
 22. Yan, A., Chen, Z., 2018. *Detection methods of nanoparticles in plant tissues*. In Özge Çelik, *New visions in plant science*. London, UK: IntechOpen; doi: 10.5772/intechopen.74101.
 23. Marchiol, L., Mattiello, A., Pošćić, F., Fellet, G., Zavalloni, C., Carlino, E., Musetti, R., 2016. Changes in physiological and agronomical parameters of barley (*Hordeum vulgare*) exposed to cerium and titanium dioxide nanoparticles. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 13(3): 332.
 24. Vollenweider, P., Cosio, C., Günthardt-Georg, M., Keller, C., 2006. Localization and effects of cadmium in leaves of a cadmium-tolerant willow (*Salix viminalis*): part II microlocalization and cellular effects of cadmium. *Environmental and Experimental Botany*: 58(1-3): 25-40.
 25. Todeschini, V., Lingua, G., D'Agostino, G., Carniato, F., Roccotello, E., Berta, G., 2011. Effects of high Zn concentration on poplar leaves: a morphological and biochemical study. *Environmental and Experimental Botany*. 71(1): 50-56.
 26. Starzecki, W., 1962. The roles of the palisade and spongy parenchyma of leaves in photosynthesis. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 31(3): 419-436.
 27. Štefanić, P.P., Cvjetko, P., Biba, R., Domijan, A.M., Letofsky-Papst, I., Tkalec, M., Šikić, S., Cindrić, M., Balen, B., 2018. Physiological, ultrastructural and proteomic responses of tobacco seedlings exposed to silver nanoparticles and silver nitrate. *Chemosphere*. 209: 640-653.
 28. Mahajan, P., Dhoke, S.K., Khanna, A.S., Tarafdar, J.C., 2011. Effect of nano-ZnO on growth of mung bean (*Vigna radiata*) and chickpea (*Cicer arietinum*) seedlings using plant agar method. *Applied Biological Research*. 13(2): 54-61.
 29. Thuesombat, P., Hannongbua, S., Akasit, S., Chadchawan, S., 2014. Effect of silver nanoparticles on rice (*Oryza sativa* L. cv. KDML 105) seed germination and seedling growth. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 104: 302-309.
 30. Pokhrel, L.R., Silva, T., Dubey, B., El Badawy, A. M., Tolaymat, T.M., Scheuerman, P.R., 2012. Rapid screening of aquatic toxicity of several metal-based nanoparticles using the MetPLATE™ bioassay. *Science of the Total Environment*. 426: 414-422.
 31. Asgari, F., Majd, A., Jonoubi, P., Najafi, F., 2018. Effects of silicon nanoparticles on molecular, chemical, structural and ultrastructural characteristics of oat (*Avena sativa* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*. 127: 152-160.
 32. Ghelich, S., Zarrinkamar, F., Lebaschi, M.H., 2014. Changes in leaf structure of *Hypericum perforatum* L. under lead treatment. *Journal of Plant Research*. 26(4): 464-453.
 33. Saderi, S.Z., Zarrinkamar, F., 2011. Effect of different concentrations of lead on anatomical structure of *Matricaria chamomilla* L. in different developmental stages. *Environmental Stresses in Crop Sciences*. 3(2): 139-149. doi: 10.22077/escs. 2011.90

34. Shi, G., Cai, Q., 2009. Leaf plasticity in peanut (*Arachis hypogaea* L.) in response to heavy metal stress. *Environmental and Experimental Botany*. 67: 112-117.
35. Maruthi Sridhar, B.B., Diehl, S.V., Han, F.X., Monts, D.L., Su, Y., 2005. Anatomical changes due to uptake and accumulation of Zn and Cd in Indian mustard (*Brassica juncea*). *Environmental and Experimental Botany*. 54(2): 131-141.
36. Iziy, E., Majd, A., Vaezi-Kakhki, M.R., Nejadstattari, T., Kazemi Noureini, S., 2019. Effects of zinc oxide nanoparticles on enzymatic and nonenzymatic antioxidant content, germination, and biochemical and ultrastructural cell characteristics of *Portulaca oleracea* L. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 88(4): 3639.
37. Qian, H., Peng, X., Han, X., Ren, J., Sun, L., Fu, Z., 2013. Comparison of the toxicity of silver nanoparticles and silver ions on the growth of terrestrial plant model *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Environmental Sciences*. 25(9): 1947-1956.
38. Li, J., Song, Y., Wu, K., Tao, Q., Liang, Y., Li, T., 2018. Effects of Cr₂O₃ nanoparticles on the chlorophyll fluorescence and chloroplast ultrastructure of soybean (*Glycine max*). *Environmental Science and Pollution Research International*. 25(20): 19446-19457.
39. Marchiol, L., Mattiello, A., Pošćić, F., Giordano, C., Musetti, R., 2014. *In vivo* synthesis of nanomaterials in plants: location of silver nanoparticles and plant metabolism. *Nanoscale Research Letters*. 9: 101.
40. Esparham, E., Saeidisar, S., Mahmoodzadeh, H., Hadi, M., 2017. The effects of zinc oxide (ZnO) nanoparticles on the germination, biochemical and ultrastructural cell characteristics of *Ricinus communis*. *Journal of Cell and Tissue*. 8(2): 151-164. doi: 10.29252/JCT.8.2.151
41. Fayez, K.A., El-Deeb, B.A., Mostafa, N.Y., 2017. Toxicity of biosynthetic silver nanoparticles on the growth, cell ultrastructure and physiological activities of barley plant. *Acta Physiologiae Plantarum*. 39: 155.
42. Evert, R.F., Eichhorn, S.E., 2006. *Esau's plant anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development*. 3rd Ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc; 601 p.
43. Jiang, H.M., Yang, J.C., Zhang, J.F., 2007. Effects of external phosphorus on the cell ultrastructure and the chlorophyll content of maize under cadmium and Zn stress. *Environmental Pollution*. 147(3): 750-756.
44. Wang, Q., Ebbs, S.D., Chen, Y., Ma, X., 2013. Trans-generational impact of cerium oxide nanoparticles on tomato plants. *Metallomics*. 5(6): 753-759.
45. Xiong, T.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.
46. López-Moreno, M.L., Avilés, L.L., Pérez, N.G., Irizarry, B.Á., Perales, O., Cedeno-Mattei, Y., Román, F., 2016. Effect of cobalt ferrite (CoFe₂O₄) nanoparticles on the growth and development of *Lycopersicon lycopersicum* (tomato plants). *Science of the Total Environment*. 550: 45-52.
47. Djearamane, S., Lim, Y.M., Wong, L.S., Lee, P.F., 2019. Cellular accumulation and cytotoxic effects of zinc oxide nanoparticles in microalga *Haematococcus pluvialis*. *PeerJ*, 7: e7582. doi: 10.7717/peerj.7582.