



## Investigating the impact of cerium oxide (CeO<sub>2</sub>) nanoparticles on structural and ultrastructural changes of marigold (*Calendula officinalis* L.) leaves

Sedighe Jahani<sup>1\*</sup>, Malihe Jahani<sup>1\*</sup>, Sara Saadatmand<sup>2</sup>, Homa Mahmoodzadeh<sup>3</sup>, Ramazan Ali Khavari-Nejad<sup>4</sup>

1. Ph.D Graduated, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Associate Professor, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3. Associate Professor, Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran
4. Full Profesor, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Place of research: Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

### Article Info

#### Article History:

received 12.15.2022  
revised 01.03.2023  
accepted 06.08.2023  
online 06.08.2023

#### KeyWords:

Peroxisome, Leaf mesophyll cell, Energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX), Transmission electron microscopy (TEM), Cerium oxide nanoparticles, Marigold

#### \*Corresponding author:

E-mail address

sedighe.jahani2010@gmail.com  
malihe.jahani2009@gmail.com  
sarasadatmand2000@gmail.com  
homa.mahmoodzadeh2000@gmail.com  
ra.khavarinejad2010@gmail.com

### Abstract

**Introduction:** Cerium oxide nanoparticles (CeO<sub>2</sub> NPs) are one of the most widely used NPs in the world and their interaction with the ecosystem is unavoidable.

**Aim:** The aim of this study was to investigate structural and ultrastructural changes in marigold leaves under CeO<sub>2</sub> NPs.

**Materials and methods:** Seeds were sown in pots under greenhouse conditions and after two weeks, seedlings were exposed to CeO<sub>2</sub> NPs (0 and 3200 µg/mL) by leaf spray for five weeks. Then, leaf morphological changes were measured. Also, sampling from the control and NPs treatment leaf were performed to investigate structural and ultrastructural changes. Tissue preparation was performed and samples were examined by light and transmission electron microscopy (TEM).

**Results:** Morphological changes including diminish in the length, width and area of marigold leaf under CeO<sub>2</sub> NPs were observed. Also, ultrastructural changes of mesophilic cells of marigold leaf under CeO<sub>2</sub> NPs including diminish of chloroplasts number and their swelling, incement of peroxisomes number, disintegration of cell membrane, and accumulation and deposition of NPs in the intercellular spaces, cell wall and membrane, vacuole, peroxisome and chloroplast stroma were observed. In addition, the results of cerium elemental assessment 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 CeO<sub>2</sub> NPs in marigold leaves

**Conclusion:** Ultrastructural damage in TEM results indicated the toxicity of high dosage of CeO<sub>2</sub> NPs at the cellular level. Therefore, potential of hazardous impacts of CeO<sub>2</sub> NPs on other medicinal plants and environment should be considered

Cite this article: Jahani S\*, Jahani M\*, Saadatmand S, Mahmoodzadeh H, Khavari-Nejad R.A. Investigating the impact of cerium oxide (CeO<sub>2</sub>) nanoparticles on structural and ultrastructural changes of marigold (*Calendula officinalis* L.) leaves. Iranian Journal of Biologiactal Sciences. 2023; 17(4): 1-22



10.30495/zisti.2023.1975082.1148

Publisher: Islamic Azad University of Varamin – Pishva branch

Print ISSN: 1735-4226

Online ISSN: 1727-459X

This is an open access article under the: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



## بررسی تاثیر نانوذرات اکسید سریوم ( $CeO_2$ ) بر تغییرات ساختاری و فراساختاری برگ گیاه همیشه بهار (*Calendula officinalis* L.)

صدیقه جهانی<sup>۱\*</sup>، ملیحه جهانی<sup>۱\*</sup>، سارا سعادتمند<sup>۲</sup>، هما محمودزاده<sup>۳</sup>، رضاعلی خاوری نژاد<sup>۴</sup>

۱. فارغ التحصیل دکتری تخصصی، گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. دانشیار، گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۳. دانشیار، گروه زیست شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران
۴. استاد، گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

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

اطلاعات مقاله	چکیده
<p><b>تاریخچه مقاله</b></p> <p>ارسال ۱۴۰۱/۰۹/۲۴</p> <p>بازنگری ۱۴۰۱/۱۰/۱۳</p> <p>پذیرش ۱۴۰۲/۰۳/۱۸</p> <p>نمایه ۱۴۰۲/۰۳/۱۸</p>	<p><b>مقدمه:</b> نانوذرات اکسید سریوم (<math>CeO_2</math> NPs)، بعنوان یکی از پرکاربردترین نانوذرات در دنیا می باشند و برهمکنش آن ها با اکسیسیستم غیر قابل اجتناب است.</p> <p><b>هدف:</b> هدف از این پژوهش بررسی تغییرات ساختاری و فراساختاری در برگ گیاه همیشه بهار تحت نانوذرات <math>CeO_2</math> بود.</p> <p><b>مواد و روش ها:</b> بذرها در گلدان ها تحت شرایط گلخانه ای کاشته شدند و بعد از دو هفته، گیاهچه ها با نانوذرات <math>CeO_2</math> (۰ و ۳۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) بصورت اسپری برگی به مدت پنج هفته تیمار شدند. سپس تغییرات مورفولوژیکی برگ اندازه گیری شد. همچنین نمونه برداری از برگ گیاه شاهد و تیمار نانوذرات به منظور بررسی تغییرات ساختاری و فراساختاری انجام گردید. مراحل آماده سازی بافت انجام شد و نمونه ها با میکروسکوپ های نوری و الکترونی گذاره (TEM) بررسی شدند.</p> <p><b>نتایج:</b> تغییرات مورفولوژیکی شامل کاهش طول، عرض و سطح برگ همیشه بهار تحت تیمار نانوذرات <math>CeO_2</math> مشاهده شد. همچنین تغییرات فراساختاری سلول های مزوفیلی برگ گیاه همیشه بهار تحت تیمار نانوذرات <math>CeO_2</math> شامل کاهش تعداد کلروپلاست ها و متورم شدن آن ها، افزایش تعداد پراکسی زوم ها، از هم پاشیدگی غشای سلولی و تجمع و رسوب نانوذرات در فضاهای بین سلولی، دیواره و غشای سلولی، واکوتل، پراکسی زوم و استرومای کلروپلاست مشاهده شد. علاوه بر این، نتایج سنجش عنصری سریوم به روش های اسپکترومتری نشری پلاسمای جفت شده القایی (ICP-OES) و طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDX)، هم راستا با نتایج TEM، نشان دهنده ی جذب و تجمع نانوذرات <math>CeO_2</math> در برگ گیاه همیشه بهار بود.</p> <p><b>نتیجه گیری:</b> آسیب های فراساختاری در نتایج TEM بیانگر سمیت غلظت بالای نانوذرات <math>CeO_2</math> در سطح سلولی بود. بنابراین اثرات خفرت احتمالی نانوذرات <math>CeO_2</math> بر روی گیاهان دارویی دیگر و محیط زیست باید در نظر گرفته شود.</p>
<p><b>کلمات کلیدی</b></p> <p>پراکسیزوم، سلول مزوفیل برگ، طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDX)، میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM)، نانوذرات اکسید سریوم، همیشه بهار</p>	
<p>* نویسنده مسؤل</p> <p>sedighe.jahani2010@gmail.com malihe.jahani2009@gmail.com sarasadatmand2000@gmail.com homa.mahmoodzadeh2000@gmail.com ra.khavarinejad2010@gmail.com</p>	

شیوه آدرس دهی این مقاله: جهانی ص<sup>۱\*</sup>، جهانی م<sup>۱\*</sup>، سعادتمند س، محمودزاده ه، خاوری نژاد ر.ج. بررسی تاثیر نانوذرات اکسید سریوم ( $CeO_2$ ) بر تغییرات ساختاری و فراساختاری برگ گیاه همیشه بهار (*Calendula officinalis* L.). مجله دانش زیستی ایران. ۱۴۰۱: ۱۷(۴): ۲۲-۱

doi 10.30495/zisti.2023.1975082.1148

DOR 20.1001.1.17354226.1402.17.4.1.1

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا    شاپا چاپی: ۱۷۳۵-۴۲۲۶    شاپا الکترونیکی: ۲۷۱۷-۴۵۹X    نویسنده گان: © حق مؤلف

## مقدمه:

۱۰۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم مهار شد. هم چنین گزارش شده است که نانوسریا موجب کاهش رشد ریشه و ساقه گیاه خیار شده و هم چنین موجب انباشت سریوم در گیاه خیار شده که ممکن است اثرات بالقوه ی سمی بر سلامت انسان از طریق ورود به زنجیره غذایی داشته باشد (۲۰).

در پژوهشی که بر روی گیاه گوجه فرنگی تحت تاثیر غلظت های ۱۰۰۰-۰ میکرو گرم بر میلی لیتر نانوسریا انجام شد، در غلظت های پایین نانوسریا (۲۰ و ۱۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر)، افزایش رشد و فتوسنتز مشاهده شد در حالی که در غلظت های بالای نانوسریا (۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر)، کاهش در رشد و فتوسنتز، افزایش در پراکسیداسیون لیپید، نشت یونی و  $H_2O_2$  و افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان مشاهده شد (۲۱). در مطالعه ای دیگر که بر روی گیاه ماش تحت تاثیر غلظت های ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر نانوسریا انجام شد، در غلظت ۲۵۰ میکرو گرم بر میلی لیتر نانوسریا، افزایش جزیی ماده خشک و تحریک فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان مشاهده شد در حالی که در غلظت ۱۰۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر نانوسریا، تجمع بالای گونه های فعال اکسیژن ( $^2ROS$ )، بزرگ شدن و تجمع دانه های نشاسته، تورم کلروپلاست ها، کاهش رنگیزه های فتوسنتزی، کاهش تثبیت نیتروژن بیولوژیکی، کلروز و تاخیر در رشد گیاه مشاهده شد (۲۲). در تحقیقی دیگر، کاهش رشد، کاهش میزان کلروفیل و آنتوسیانین و افزایش فعالیت آنزیم های کاتالاز و پراکسیداز در گیاه لوبیای تحت غلظت ۲۰۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر نانوسریا گزارش شد (۲۳).

با وجود اهمیت گیاهان دارویی بر سلامت انسان، تاکنون مطالعات اندکی در ارتباط با تاثیر نانوسریا بر گیاهان دارویی انجام شده است. بعنوان مثال در پژوهشی بر روی گیاه مریم گلی (*Salvia miltiorrhiza*)، غلظت های ۲۵۰ و ۵۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر نانوسریا، تاثیر مثبتی بر ویژگی های مورفوفیزیولوژیکی و فعالیت آنزیم های

نانوتکنولوژی، فناوری جدیدی است که شامل تولید و استفاده از مواد با حداقل بعد و کمتر از ۱۰۰ نانومتر می باشد. اندازه کوچک نانوذرات منجر به ایجاد سطح بزرگ تر و واکنش پذیری بیشتر در مقایسه با ترکیبات غیرنانو شده است (۲،۱). استفاده گسترده از نانوذرات مسیر ورود آن ها را به خاک، اتمسفر و آب فراهم کرده و می توانند بر گیاهان تاثیر بگذارند که تاثیر نانوذرات بسته به نوع نانوذره و هم چنین گونه گیاهی متفاوت می باشد (۴،۳،۱).

سریوم ( $Ce$ ) یکی از فراوان ترین عناصر خاکی کمیاب ( $REE^1$ ) در پوسته زمین است. این عنصر به طور طبیعی به شکل سه ظرفیتی سروس ( $Ce^{+3}$ ) و چهارظرفیتی سربیک ( $Ce^{+4}$ ) پایدار می باشد (۱۰-۵). اکسید سریوم (سریا) یکی از اکسیدهای فلزی لانتانید است که به داشتن پتانسیل اکسایش-کاهش معروف است و به طور گسترده در صنایع مختلف استفاده می گردد (۱۱).

نانوذرات اکسید سریوم ( $CeO_2$ ) یا نانوسریا در میان ۱۰ نانوذره عمده ی تولیدشده در دنیا قرار دارند. نانوذرات  $CeO_2$  دارای کاربردهای گسترده ای شامل ویژگی های کاتالیزوری، آنتی اکسیدانی، بعنوان الکترولیت سلول سوختی، حسگرهای گازی، پمپ های اکسیژن، جاذب UV، پوشش دهنده و صیقل دهنده ی شیشه و لایه های سیلیکونی، در متالوژی، شیشه و سرامیک و به صورت مواد افزودنی سوخت دیزل دارند (۱۵-۱۲).

بر طبق تحقیقات انجام شده، نتایج متفاوتی در مورد تاثیر نانوسریا بر رشد، فیزیولوژی و متابولیسم گیاهان گزارش شده است (۲۰-۱۶). Ma و همکاران (۱۸) بیان کردند که در غلظت ۲۰۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر نانوسریا، کاهش طول ریشه در گیاه کاهو مشاهده شد، اما طول ریشه در گیاهان گوجه فرنگی، تربچه، گندم، کلزا، کلم و خیار تغییری نداشت. Gui و همکاران (۱۹) بیان کردند که نانوسریا به وسیله ریشه گیاه کاهو جذب شدند و اثر مثبتی بر رشد گیاه در غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم داشتند، در حالی که رشد گیاه در غلظت

Rare earth element ۱

Reactive oxygen species ۲

مطالعات ساختاری و فراساختاری اهمیت بالایی در ایجاد درک عمیق در سطح سلولی در زمینه ی برهمکنش نانوذرات با گیاهان دارند. تاکنون پژوهشی بر روی ویژگی های ساختاری و فراساختاری برگ گیاه همیشه بهار تحت تاثیر نانوذرات اکسید سربوم انجام نشده است. با توجه به اهمیت گیاه همیشه بهار بعنوان یک گیاه دارویی-زینتی و هم چنین با توجه به پیشرفت سریع نانو تکنولوژی و افزایش روز افزون استفاده از نانوذرات اکسید سربوم بعنوان یکی از پرکاربردترین نانوذرات اکسید فلزی در صنایع مختلف و در نتیجه با ورود فاضلاب یا پساب حاصل از محصولات نانو فناوری شده به محیط زیست و زمین های کشاورزی، آزادسازی این ترکیبات به محیط زیست اجتناب ناپذیر می باشد و در نتیجه باعث افزایش احتمال قرار گرفتن گیاهان در معرض نانوذرات می شود که باعث افزایش خطرات زیست محیطی، آسیب به اکوسیستم، تنوع زیستی و تولید محصول می شود. هدف از این پژوهش بررسی تاثیر نانوذرات اکسید سربوم بر ویژگی های ساختاری و فراساختاری و تجمع سربوم در برگ گیاه همیشه بهار (*Calendula officinalis* L.) بود.

آنتی اکسیدان نشان داد (۲۴). در تحقیقی دیگر بر روی گیاه گشنیز، غلظت ۱۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم نانوسربیا باعث افزایش در رشد ریشه و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان شد و در غلظت ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم نانوسربیا، بیشترین تجمع سربوم مشاهده شد (۲۵). گیاه همیشه بهار (*Calendula officinalis* L.) از خانواده کاسنی (*Asteraceae*)، گیاهی بوته ای، معطر، دارویی و زینتی با گل های زرد و نارنجی است. عمده ترین مواد موثر این گیاه شامل ترپنوئیدها، ترکیبات فنلی، کومارین ها، کوئینون ها، کاروتنوئیدها و اسیدهای آمینه می باشد (۲۶-۲۷). عمده ترین مواد موثر این گیاه در گل ها تولید و تجمع می یابند. عصاره همیشه بهار دارای اثرات دارویی از قبیل خواب آور، آنتی اکسیدان، ضد سرطان، ضد التهاب پوستی، ضد قارچ و باکتری، ضد انگل و تصفیه کننده خون است (۲۷-۲۸).

## مواد و روش ها

### آنالیز خصوصیات نانوذرات CeO<sub>2</sub>

نانوذرات CeO<sub>2</sub> به صورت پودر زرد کم رنگ با خلوص ۹۹/۹۷٪ و دارای چگالی ۳g/cm<sup>3</sup> - ۷/۱۳ بود. آنالیزهای مرتبط با خصوصیات نانوذرات CeO<sub>2</sub> در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد. به منظور بررسی مورفولوژی و اندازه نانوذرات از میکروسکوپ الکترونی (LEO TEM ۹۱۲ AB, Zeiss, UK) استفاده شد. به منظور بررسی نمونه با میکروسکوپ TEM، میزان ۰/۰۰۱ گرم پودر نانوذرات CeO<sub>2</sub> را بر روی گرید مسی میکروسکوپ الکترونی TEM قرار داده و تصویر برداری با بزرگنمایی در مقیاس ۵۰ نانومتر انجام شد.

به منظور بررسی تصویر توپوگرافی و ارتفاع نانوذرات از میکروسکوپ (AFM (ENTEGR, NT-MDT, Russia) استفاده شد. بدین منظور ابتدا ۰/۰۰۱ گرم پودر نانوذرات CeO<sub>2</sub> در ۱۰ میلی لیتر آب دیونیزه مخلوط شد. سپس به مدت ۱ ساعت در دستگاه اولتراسونیک در دمای ۲۵ °C همگن شد. سپس ۱ میلی لیتر از آن را برداشته

### تهیه و آماده سازی نانوذرات اکسید سربوم (CeO<sub>2</sub> NPs)

پودر نانوذرات CeO<sub>2</sub> (برند US Research Nanomaterials) از شرکت نانوپیشگامان نانومواد ایرانیان در مشهد خریداری شد. در این پژوهش، غلظت نانوذرات CeO<sub>2</sub> بر اساس پژوهش های گذشته ی محققان تعیین شد (۲۳، ۲۹، ۳۰). به منظور تهیه سوسپانسیون نانوذرات CeO<sub>2</sub> (۳۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر)، ابتدا مقدار ۳/۲ گرم از پودر نانوذرات CeO<sub>2</sub> 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 ۲۴۰۰ S3, W ۱۰۰, Hz ۴۰) به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده تا سوسپانسیون نانوذرات CeO<sub>2</sub> تحت امواج اولتراسونیک قرار گرفته تا به خوبی در آب دیونیزه همگن شود. فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان در برگ مورد سنجش قرار گرفت.

### تهیه بذر، کاشت و اعمال تیمار

به منظور مطالعه اثر نانوذرات  $CeO_2$  بر ویژگی های ساختاری و فراساختاری برگ گیاه همیشه بهار، پژوهشی در شرایط گلخانه ای کنترل شده (دما  $25 \pm 2^\circ C$ ، رطوبت نسبی ۳۵٪، نور با شدت ۱۰۰۰۰ لوکس، فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) به صورت یک طرح کاملاً تصادفی در دو تیمار (۰ و ۳۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) و ۴ تکرار انجام شد. بذر گیاه همیشه بهار واریته Gitana Orange (برند همزادان هلند) از شرکت سبز نمین در تهران تهیه شد. گلدان های پلاستیکی ۲ کیلویی با خاک زراعی مناسب (مخلوطی از لوم، رس و شن با نسبت ۲:۲:۱) پر شدند. هر تیمار شامل ۴ گلدان و هر گلدان حاوی ۷ عدد بذر همیشه بهار 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 خط کش و هم چنین سطح برگ با استفاده از کاغذ شطرنجی اندازه گیری شد.

### آماده سازی نمونه برای مطالعه با میکروسکوپ های نوری و الکترونی گذاره (TEM)

به منظور بررسی های ساختاری و فراساختاری، از برگ گیاه شاهد و برگ تیمار ۳۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر نانوذرات  $CeO_2$ ، ابتدا نمونه های برگ تازه (۱ میلی متر مربع) با گلوکار آلدئید ۶٪ در بافر کاکودیلات سدیم ۰/۱ مولار با pH ۷/۵ به مدت ۶ ساعت در دمای  $4^\circ C$  تثبیت شدند و سپس با تترآکسید اسمیوم ۱٪ به مدت ۲ ساعت در دمای  $4^\circ C$ ، در غلظت های مختلف الکل (۳۰، ۵۰، ۷۰ و ۱۰۰ درصد)، آبگیری شده و سپس از نسبت 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، نمونه ها قالب گیری شدند و در آون در دمای  $60^\circ C$  به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفتند. برش های نیمه نازک (با ضخامت ۰/۵ میکرون) و بسیار نازک (با ضخامت ۶۰ تا ۸۰ نانومتر) با استفاده از تیغ الماس و به کمک دستگاه اولترامیکروتوم (Ultracut UCT, Leica, Austria) تهیه شدند. برش های نیمه نازک با آبی تولوئیدن در سدیم بورات ۱٪ به مدت

و پس از خشک شدن بر روی صفحه ی میکا، بر روی جایگاه دستگاه میکروسکوپ AFM قرار داده شد و سپس تصویربرداری توپوگرافی نانوذرات  $CeO_2$  با بزرگنمایی در مقیاس ۳ میکرومتر انجام شد.

به منظور آماده سازی نمونه برای آنالیز طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDX)، ۰/۰۰۱ گرم پودر نانوذرات  $CeO_2$  بر روی پایه مخصوص دستگاه با چسب کربنی چسبانده شد و سپس با دستگاه Sputter Coating (CCV150, England) به مدت ۱۰۰ تا ۱۵۰ ثانیه با  $MA_{20}$  پوشش دهی با طلا انجام شد و سپس آنالیز عنصری نانوذرات  $CeO_2$  بوسیله دستگاه EDX (SAMx Germany) سنجش شد. هم چنین به منظور تعیین فاز و درجه خلوص نانوذرات از دستگاه پراش اشعه ایکس (EXPLORER, XRD) (GNR, ۴۰ kV, ۳۰ mA, Italy) در طول موج  $\lambda = 1.54$  آنکستروم استفاده شد.

علاوه بر این، اندازه گیری قطر هیدرودینامیکی نانوذرات به روش پراکندگی نور دینامیکی (DLS) توسط دستگاه پارتیکل سائزر آنالیزر (VASC0 3, Cordouan, Pessac, France) بر اساس تعداد و با تعیین متوسط سائز قطر هیدرودینامیک و شاخص پراکندگی انجام شد. بدین منظور مقدار ۰/۰۰۱ گرم نانوذرات  $CeO_2$  در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر مخلوط شدند، سپس با استفاده از دستگاه اولتراسونیک به مدت ۳۰ دقیقه در دمای  $25^\circ C$  همگن شدند. سپس مقدار ۰/۵ میلی لیتر از آن بر روی جایگاه دستگاه تعیین اندازه ذرات (VASC0 3, Cordouan, Pessac, France) قرار داده شد و اندازه نانوذرات  $CeO_2$  در طول موج ۶۵۷ نانومتر و دمای  $25^\circ C$  تعیین شد. هم چنین به منظور بررسی پایداری کلوئیدهای تشکیل شده نانوذرات، پتانسیل زتا نانوذرات با استفاده از دستگاه زتا سائزر (Zetasizer nano-ZS ZEN360) سنجش شد. بدین منظور ۶ میلی لیتر سوسپانسیون همگن شده ی نانوذرات (ذکر شده در قسمت آماده سازی نمونه برای DLS) بر روی جایگاه دستگاه پتانسیل زتا قرار داده شد و پتانسیل زتا نانوذرات  $CeO_2$  در دمای  $22^\circ C$  اندازه گیری شد.

ARCOS, ۷۶۰۰۴۵۵۵ با دقت بسیار بالا سنجش شد (۲۲).

#### آنالیز سنجش عنصری EDX به منظور سنجش عنصر

##### سریوم در نمونه برگ شاهد و تیمار نانوذرات CeO<sub>2</sub>

ابتدا مقداری نمونه تازه برگ شاهد و تیمار نانوذرات CeO<sub>2</sub> (۳۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) را در آون (UN۳۰), Memmert GmbH, Germany) در دمای ۷۰ °C به مدت ۴۸ ساعت قرار داده تا خشک شود و سپس توسط آسیاب برقی (MM۴۰۰, Retsch, Germany) پودر شد. سپس به منظور آماده سازی نمونه برای آنالیز EDX، ۰/۰۰۱ گرم پودر خشک شده برگ نمونه شاهد و تیمار نانوذرات CeO<sub>2</sub> بر روی پایه مخصوص دستگاه با چسب کربنی چسبانده شد و سپس با دستگاه Sputter (CCV1۵۰, Coating, England) به مدت ۱۰۰ تا ۱۵۰ ثانیه با mA۲۰، پوشش دهی با طلا انجام شد و سپس آنالیز عنصری به منظور سنجش عنصر سریوم 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 داده ها از نرم افزار SPSS v ۲۲ استفاده شد و مقایسه میانگین داده ها با استفاده از آزمون Independent samples t-test انجام شد و سپس نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel رسم شد. ارزش معنی داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

۲ تا ۳ دقیقه، رنگ آمیزی شده و سپس ساختار برگ با میکروسکوپ نوری (Japan, ۵۱ Olympus BX) متصل به دوربین دیجیتال (۷۱ Olympus DP) مشاهده و مورد بررسی قرار گرفت (۱۹). برش های بسیار نازک بر روی صفحات مشبک مسی قرار گرفتند. سپس رنگ آمیزی نمونه ها با استات اورانیوم ۱٪ به مدت ۲۰ دقیقه و یا سیترات سرب ۲٪ به مدت ۶ دقیقه انجام گردید و در نهایت نمونه ها به منظور بررسی فراساختار سلولی توسط میکروسکوپ (LEO TEM ۹۱۲ (AB, Zeiss, Germany) مشاهده و عکس برداری صورت گرفت (۳۱، ۳۲).

#### سنجش میزان تجمع عنصر سریوم با دستگاه

##### اسپکترومتري نشري پلاسمای جفت شده القايي (ICP-OES)

برای سنجش میزان سریوم در برگ، ابتدا خاکستر تر گیاهی تهیه شد. بدین منظور نمونه های برگ تازه در آون (UN۳۰, Memmert GmbH, Germany) در دمای ۷۰ °C به مدت ۴۸ ساعت خشک شد و با آسیاب برقی (MM۴۰۰, Retsch, Germany) پودر شد، سپس برای هضم بافت به ارلن های حاوی ۰/۵ گرم از پودر تهیه شده، ۱۰ میلی لیتر مخلوطی از آب اکسیژنه و اسید نیتریک به نسبت ۵:۱ (حجمی-حجمی) اضافه کرده و سپس بر روی اجاق برقی قرار داده شد تا محلول شفاف و بی رنگی بدست آید. سپس با استفاده از آب دیونیزه، حجم اندک محلول باقیمانده به حجم ۵۰ میلی لیتر رسانده شد و بدین ترتیب خاکستر تر بدست آمد. سپس میزان عنصر سریوم در محلول بدست آمده با استفاده از دستگاه ICP-OES مدل SPECTRO

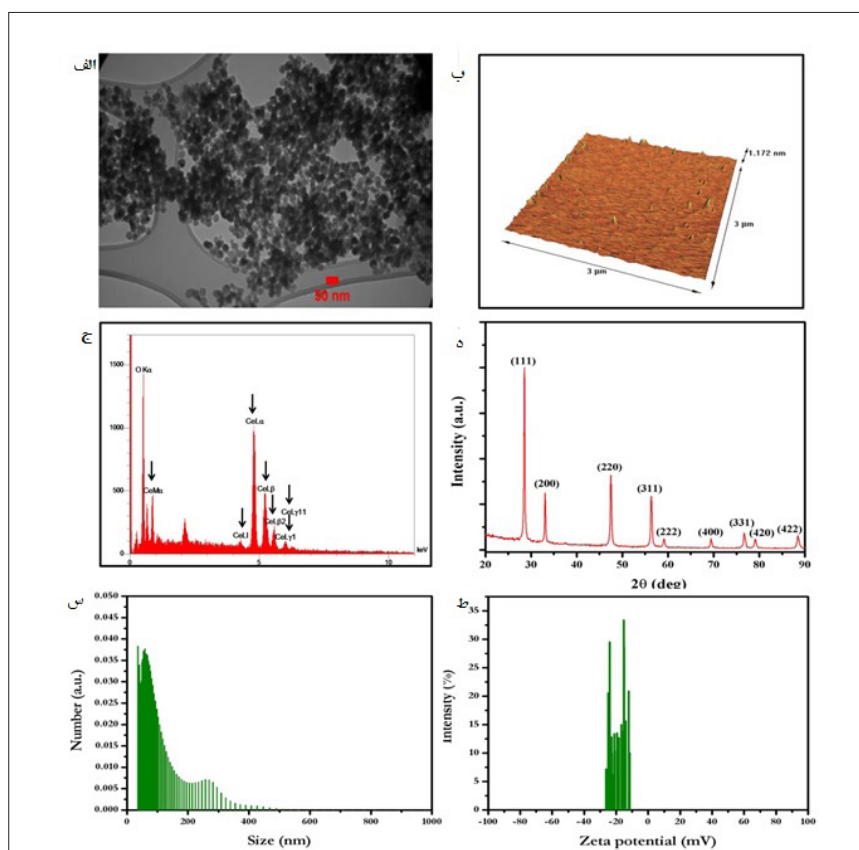
## نتایج

### نتایج خصوصیات نانوذرات CeO<sub>2</sub>

در تصویر میکروسکوپ الکترونی TEM، اندازه ی نانوذرات CeO<sub>2</sub> کوچکتر از ۵۰ نانومتر بود (شکل a). در تصویر توپوگرافی بدست آمده از AFM، ارتفاع نانوذرات CeO<sub>2</sub> ۱/۱۷ نانومتر تعیین گردید (شکل b).

در آنالیز عنصری EDX نانوذرات CeO<sub>2</sub>، همه ذرات شناسایی شده شامل سریوم و اکسیژن بودند. در این آنالیز، فلش های سیاه رنگ بیانگر پیک های سریوم (CeL<sub>γ</sub>11, CeL<sub>γ</sub>1, CeL<sub>β</sub>2, CeL<sub>β</sub>, CeLa, CeLI, CeMa)





شکل ۱- الف) تصاویر میکروسکوپ الکترونی TEM (بزرگنمایی ۵۰ نانومتر) ب) توپوگرافی میکروسکوپ AFM (ج) آنالیز خصوصیات EDX (د) XRD (س) قطر هیدرودینامیکی (بر اساس تعداد) با استفاده از تکنیک DLS (ط) پتانسیل زتا نانوذرات CeO<sub>2</sub>

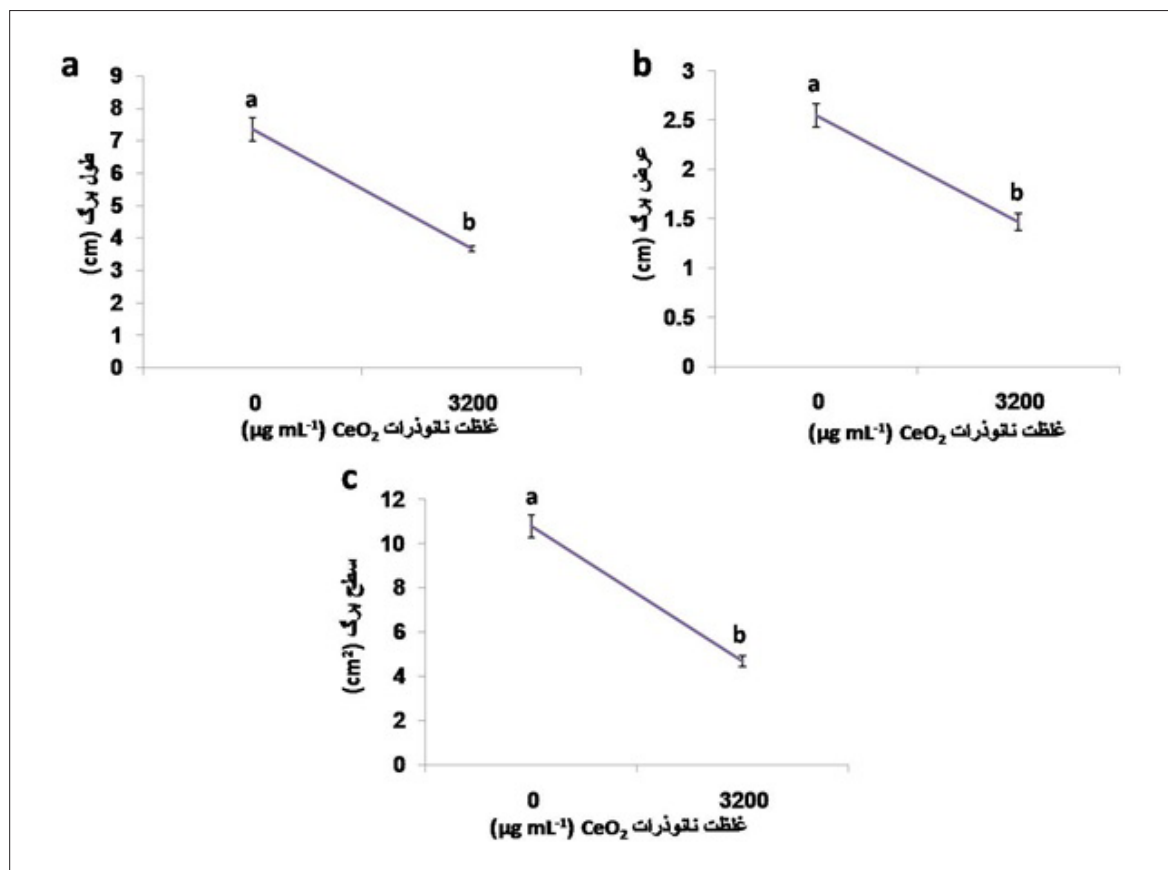
می باشند (شکل ۱c). هم چنین ساختار نانوذرات CeO<sub>2</sub> با استفاده از دستگاه XRD بین زاویه ۲۰° تا ۹۰° تعیین گردید. پیک‌های به دست آمده در زوایای ۲۸/۵۴، ۳۳/۰۷، ۴۷/۶۱، ۵۶/۳۴، ۵۹/۲۲، ۶۹/۶۲، ۷۶/۹۲، ۷۹/۰۶ و ۸۸/۴۳ به ترتیب مربوط به پراش از صفحات (۱۱۱)، (۲۰۰)، (۲۲۰)، (۳۱۱)، (۲۲۲)، (۴۰۰)، (۳۳۱)، (۴۲۰) و (۴۲۲) مطابق با کارت استاندارد Card No ۴-PDF ۰۴-۰۱۳-۰۴ ۶۵۷۲ مربوط به نانوذرات CeO<sub>2</sub> با ساختار فازی مکعبی خالص بودند. هم چنین نانوذرات CeO<sub>2</sub> تک فاز بودند و فاز فرعی و جزئی در این نانوذرات مشاهده نشد (شکل ۱d). علاوه بر این، قطر هیدرودینامیک نانوذرات CeO<sub>2</sub> با استفاده از DLS و بر اساس تعداد تعیین شد که

۹۱/۸۵ نانومتر بود. نتایج DLS نشان داد که متوسط سایز قطر هیدرودینامیک نانوذرات CeO<sub>2</sub>، ۹۰/۸۵ نانومتر بود و شاخص پراکندگی آن برابر با ۰/۲۴۵ بود (شکل ۱e). هم چنین پتانسیل زتای نانوذرات CeO<sub>2</sub> در ۶/۳۳ pH برابر با -۱۹/۴۰ میلی ولت بود (شکل ۱f).  
تاثیر نانوذرات CeO<sub>2</sub> بر رشد برگ شامل طول، عرض و سطح برگ گیاه همیشه بهار در شکل ۲، تاثیر غلظت های نانوذرات CeO<sub>2</sub> (۰ و ۳۲۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر) بر رشد برگ گیاهان همیشه بهار مشاهده شد. نتایج نشان داد که نانوذرات CeO<sub>2</sub> باعث کاهش معنی داری در رشد برگ شامل طول،

(۳۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) به ترتیب ۰/۰۶، ۰/۳۵ و ۵۶/۴۴ درصد نسبت به شاهد کاهش یافت (شکل ۳).

عرض و سطح برگ همیشه بهار شد (شکل ۳). طول، عرض و سطح برگ مربوط به تیمار نانوذرات  $CeO_2$

شکل ۲- تاثیر غلظت های نانوذرات اکسید سربوم ( $CeO_2$ ) (۰ و ۳۲۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر) بر رشد برگ گیاه همیشه بهار.



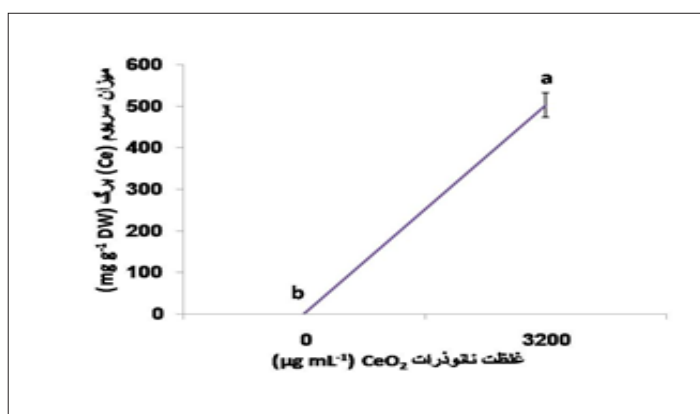
شکل ۳: تاثیر غلظت های نانوذرات  $CeO_2$  (۰ و ۳۲۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر) بر رشد برگ شامل طول (a)، عرض (b) و سطح (c) برگ گیاه همیشه بهار. در هر ستون حروف مشترک نشان دهنده ی عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح  $P \geq 0.05$  است.



تیمار ۳۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر نانوذرات  $CeO_2$ ، ۵۰۳/۰۹ میلی گرم بر کیلوگرم وزن خشک بود و میزان سربوم در برگ شاهد صفر میلی گرم بر کیلوگرم وزن خشک بود و برگ شاهد فاقد سربوم بود.

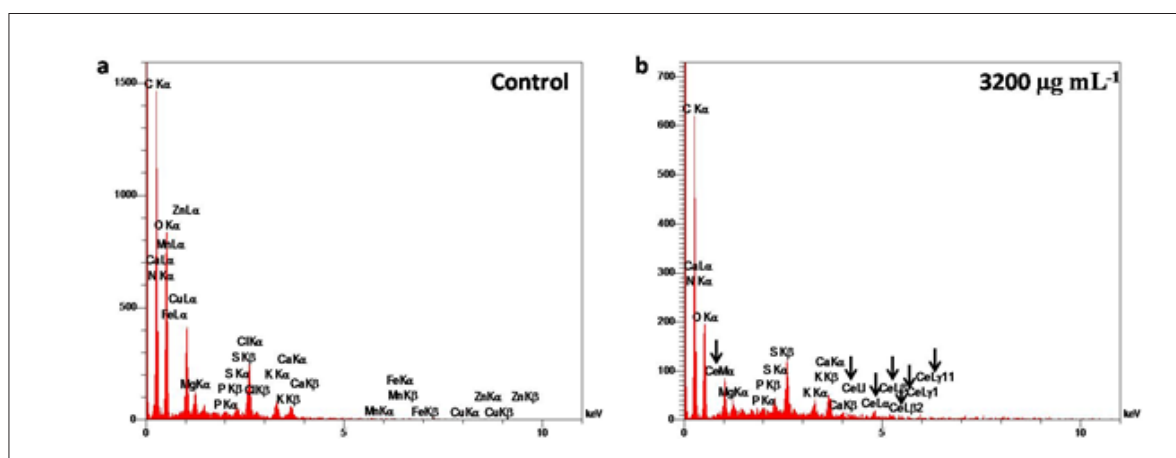
تأثیر نانوذرات  $CeO_2$  بر میزان تجمع سربوم برگ گیاه همیشه بهار نتایج نشان داد که نانوذرات  $CeO_2$  بر میزان تجمع سربوم برگ از لحاظ آماری افزایش معنی دار قابل توجهی را نشان داد (شکل ۴). میزان سربوم برگ

**شکل ۴:** تأثیر غلظت های نانوذرات  $CeO_2$  (۰ و ۳۲۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر) بر میزان سربوم برگ گیاه همیشه بهار. در هر ستون حروف مشترک نشان دهنده ی عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح  $P \geq 0.05$  است.

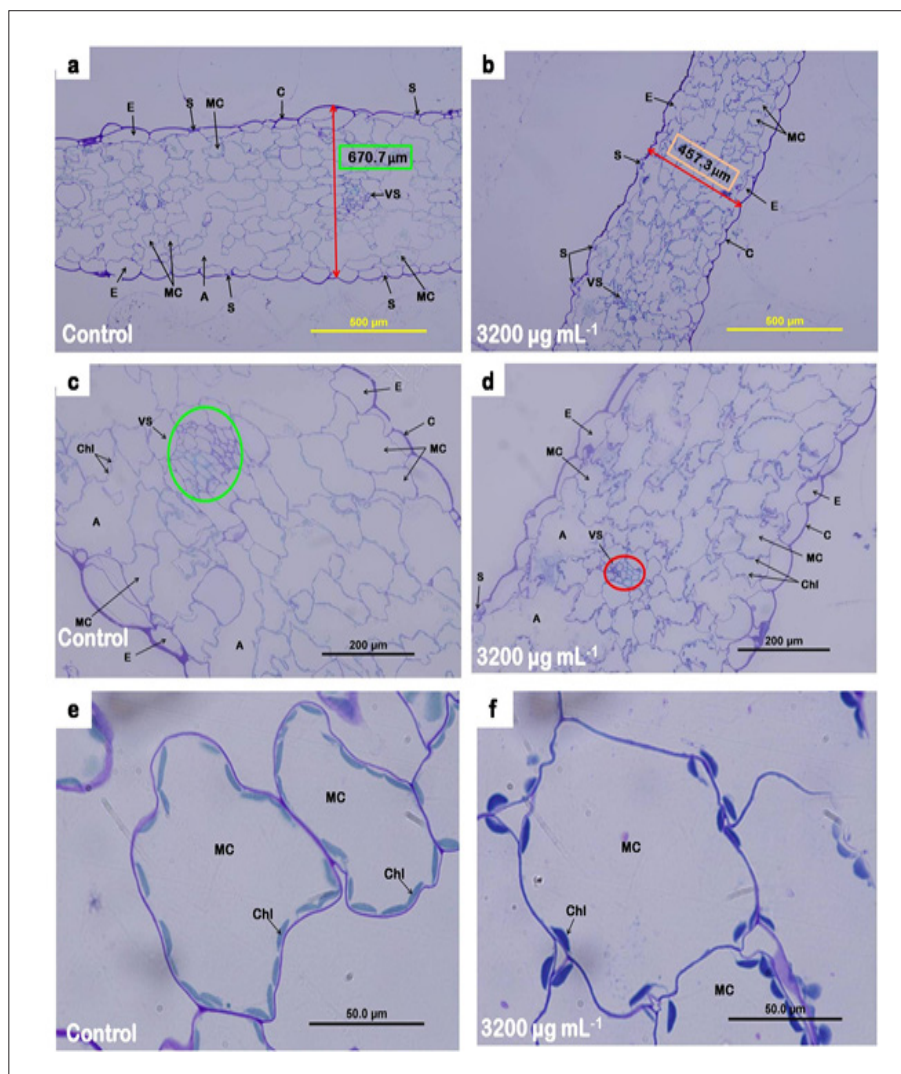


فلش های سیاه رنگ بیانگر پیک های سربوم ( $CeLy11, CeLy1, CeL\beta 2, CeL\beta, CeLa, CeLI, CeMa$ ) می باشند که تمامی پیک های عنصر سربوم در نمونه برگ تیمار نانوذرات  $CeO_2$  مشاهده شد و نمونه برگ شاهد فاقد پیک سربوم بود.

آنالیز سنجش عنصری EDX به منظور سنجش عنصر سربوم در نمونه برگ شاهد و برگ تیمار نانوذرات  $CeO_2$  آنالیز EDX نمونه پودر خشک شده ی برگ شاهد و برگ تیمار نانوذرات  $CeO_2$  (۳۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) سنجش شد (شکل ۵). در شکل ۵،



**شکل ۵:** آنالیز EDX نمونه برگ شاهد (a) و برگ تیمار نانوذرات  $CeO_2$  (۳۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) (b)، فلش های سیاه رنگ بیانگر پیک های سربوم ( $CeLy11, CeLy1, CeL\beta 2, CeL\beta, CeLa, CeLI, CeMa$ ) می باشند.

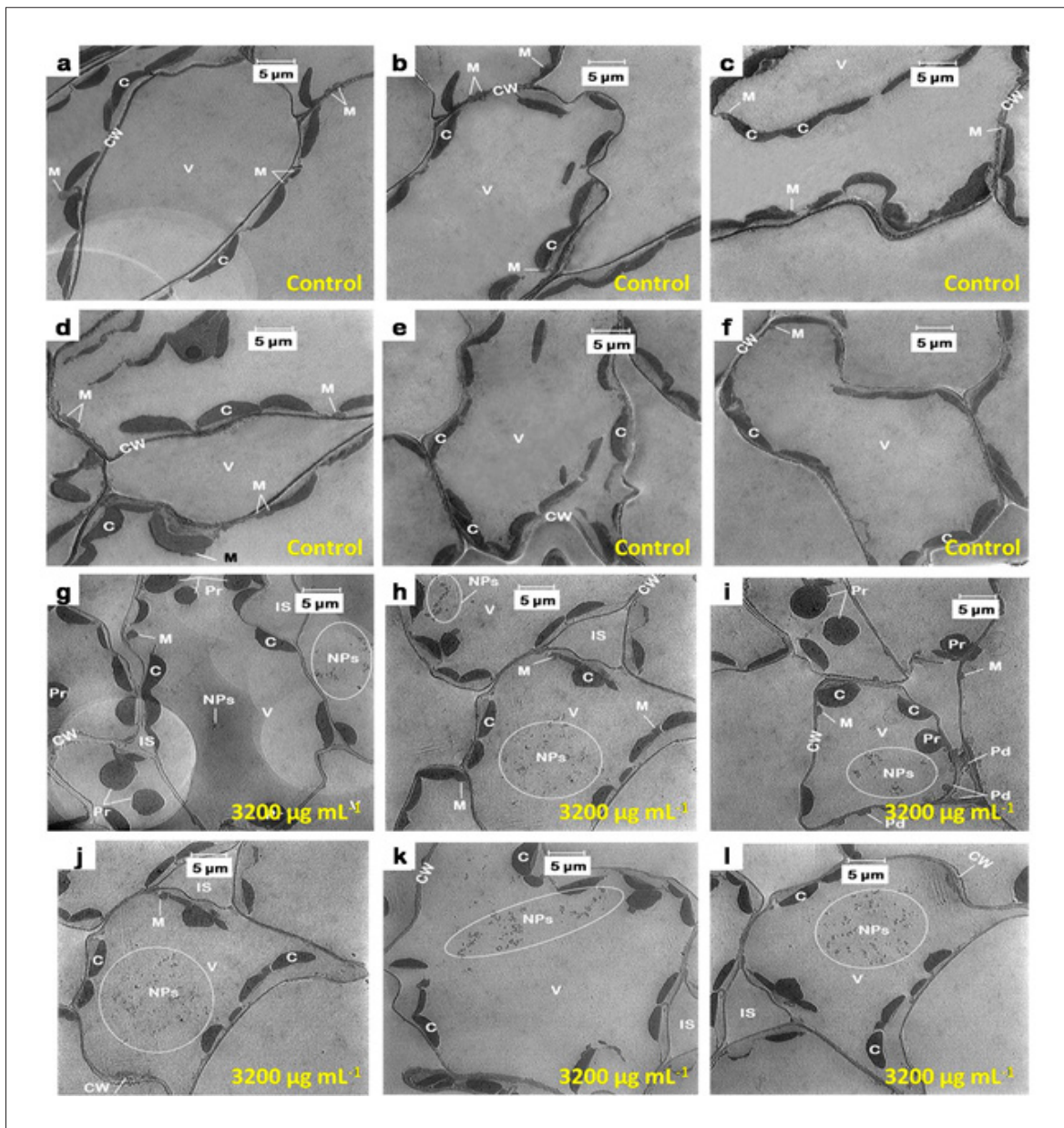


شکل ۶: برش عرضی پهنک برگ گیاه همیشه بهار در نمونه شاهد (a,c,e) و نمونه تحت تیمار نانوذرات  $\text{CeO}_2$  (۳۲۰۰ میکرو گرم بر میلی-لیتر) (b,d,f) به ترتیب با بزرگنمایی های ۵۰۰، ۲۰۰، ۵۰ میکرومتر (MC: سلول مزوفیل، Chl: کلروپلاست، C: کوتیکول، E: اپیدرم، A: حفره هوا، S: روزنه، VS: دسته آوندی).

برگ تحت تیمار نانوذرات نسبت به برگ شاهد مشاهده شد (شکل a-d۱). هم چنین کاهش تعداد کلروپلاست ها در بافت مزوفیل برگ تحت تیمار نانوذرات نسبت به بافت مزوفیل برگ شاهد مشاهده شد (شکل e-f۱). ضخامت پهنک برگ تحت تیمار نانوذرات  $\text{CeO}_2$ ، نسبت به ضخامت پهنک برگ شاهد کاهش یافت، به طوری که ضخامت پهنک برگ در گیاه شاهد از ۷/۶۷ میکرومتر به ۳/۴۵ میکرومتر در برگ گیاه

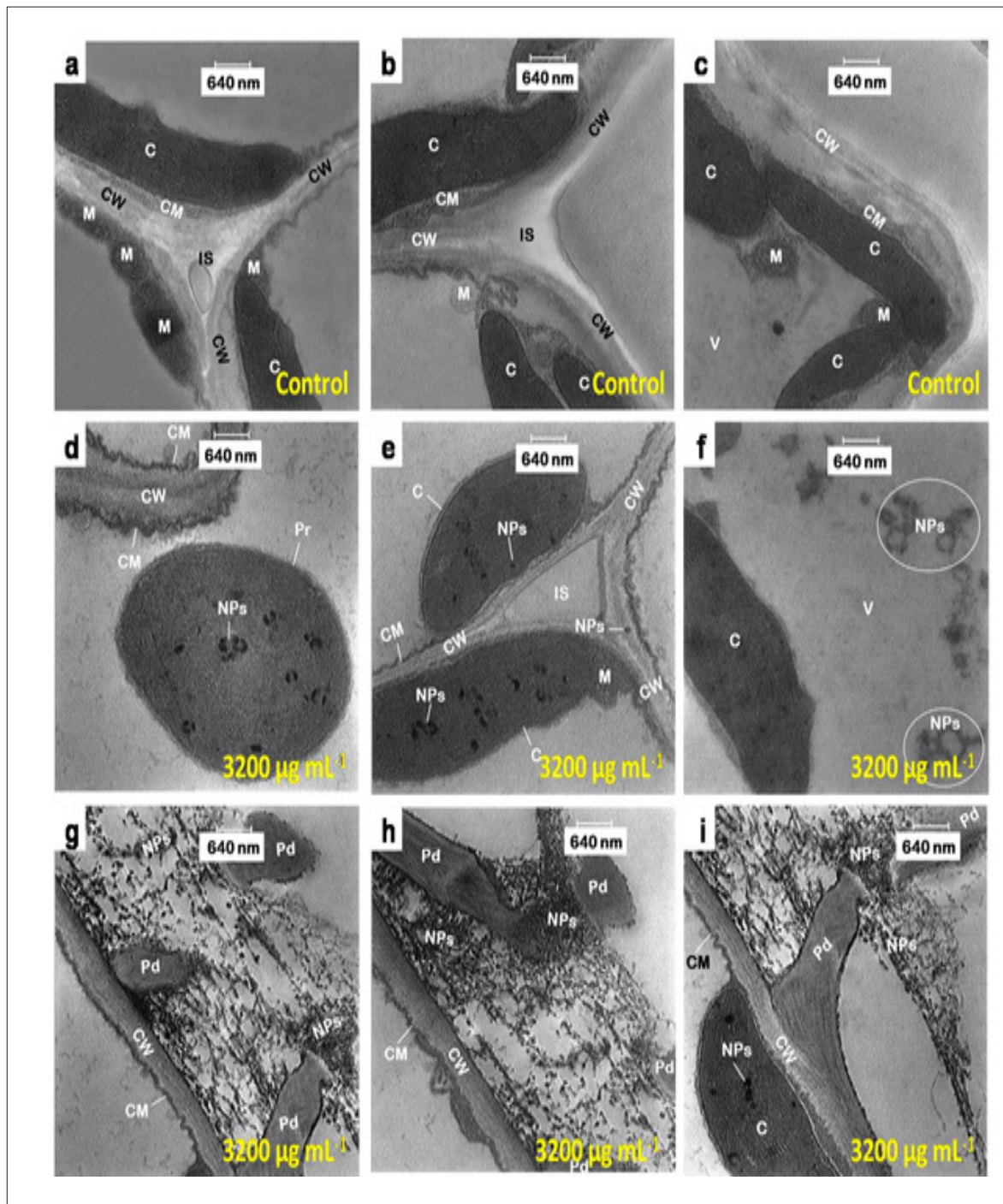
تاثیر نانوذرات  $\text{CeO}_2$  بر ساختار برگ گیاه همیشه بهار در این مطالعه، ساختار تشریحی برگ گیاه همیشه بهار در گیاه شاهد و گیاه تحت تیمار نانوذرات  $\text{CeO}_2$  (غلظت ۳۲۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر)، با تهیه برش های نیمه نازک از برگ ها و رنگ آمیزی با آبی-تولوئیدن و مشاهده با میکروسکوپ نوری بررسی شد (شکل ۶). بر طبق نتایج تحقیق حاضر، بهم ریختگی بافت مزوفیل در

تحت تیمار نانوذرات رسید (شکل a-b۶). هم چنین کاهش ضخامت در بافت مزوفیل (شکل a-b۶) و دسته آوندی (شکل c-d۶) در نمونه تحت تیمار نسبت به شاهد مشاهده شد.

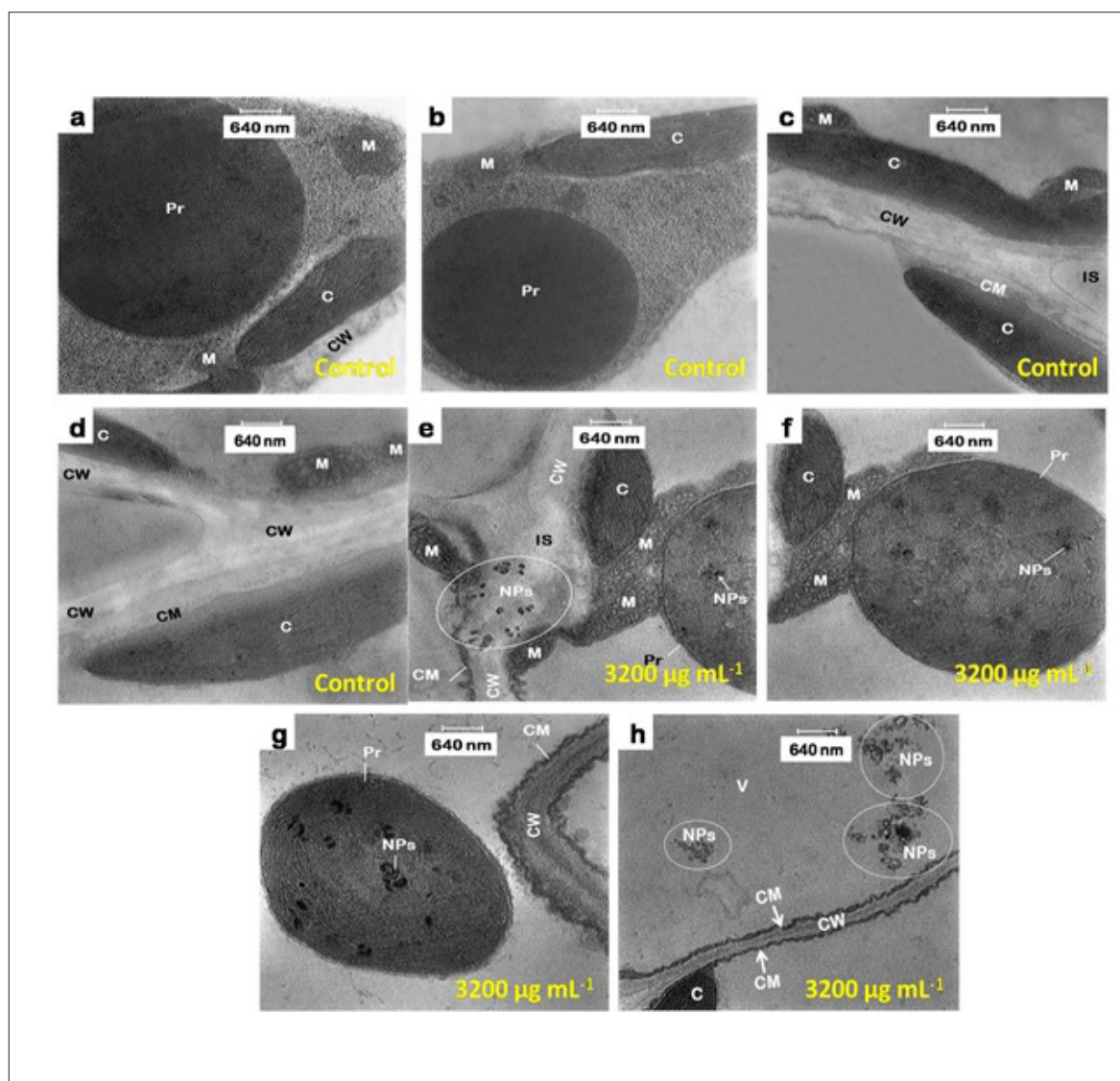


شکل ۷: ریزنگاره های TEM سلول های مزوفیلی برگ شاهد (a-f) و برگ تحت تیمار ۳۲۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر نانوذرات  $CeO_2$  (g-l). در گیاه همیشه بهار با بزرگنمایی ۵ میکرومتر (C: کلروپلاست، CW: دیواره سلولی، IS: فضای بین سلولی، M: میتوکندری، NPs: نانوذرات، Pd: پلاسمودسما، Pr: پراکسیزوم، V: واکوئل).





**شکل ۸:** ریزنگاره های TEM سلول های مزوفیلی برگ شاهد (a-c) و برگ تحت تیمار ۳۲۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر نانوذرات  $\text{CeO}_2$  (d-i) در گیاه همیشه بهار با بزرگنمایی ۶۴۰ نانومتر (C: کلروپلاست، CM: غشای سلولی، CW: دیواره سلولی، IS: فضای بین سلولی، M: میتوکندری، NP<sub>s</sub>: نانوذرات، Pd: پلاسمودسماتا، Pr: پراکسیزوم، V: واکوئل).



شکل ۹: ریزنگاره های TEM سلول های مزوفیلی برگ شاهد (a-d) و برگ تحت تیمار ۳۲۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر نانوذرات CeO<sub>2</sub> (e-h) در گیاه همیشه بهار با بزرگنمایی ۶۴۰ نانومتر (C: کلروپلاست، CM: غشای سلولی، CW: دیواره سلولی، IS: فضای بین سلولی، M: میتوکندری، NPs: نانوذرات، Pr: پراکسیزوم، V: واکوئل).

## بحث

روش های مختلفی از جمله ICP-MS، ICP-OES، TEM، EDX، تکنیک های ردیابی پرتو و غیره قابل بررسی است (۳۴). نتایج تحقیق حاضر، کاهش طول، عرض و سطح برگ در گیاه همیشه بهار تحت تیمار نانوذرات CeO<sub>2</sub> را نشان داد. همسو با نتایج تحقیق حاضر، کاهش سطح برگ در گیاه کلزای تحت غلظت های ۵۰۰ تا ۴۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر

امروزه صنعت نانوتکنولوژی یک بخش در حال گسترش است. مدیریت تاثیرات محیطی نانومواد مهندسی شده، نیاز به درک خطرات بالقوه آن ها دارد (۳۳،۲۹،۳). مطالعات گذشته نشان می دهند که تیمار با نانوذرات اکسید فلزی سبب تجمع آن در بافت های مختلف گونه های گیاهی می شود که با

شوند (۴۱،۱۷). در تحقیقی، Hong و همکاران (۴۱) بیان کردند که در گیاهان خیار تحت اسپری برگ‌ها با نانوسریا، نانوذرات از طریق هیداتود (بخش‌های آزاد کوتیکولی) و روزنه‌های هوایی نفوذ کرده و به دیواره‌های سلول‌های پارانشیم نردبانی و آبکش برگ می‌رسند و در کل گیاه توزیع می‌شوند.

هم‌چنین در مطالعه‌ی حاضر هم‌راستا با نتایج ICP-OES، نتایج آنالیز عنصری EDX نیز تجمع عنصر سربوم را در برگ گیاه همیشه بهار تحت تیمار نانوذرات اکسید سربوم (۳۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تایید کرد. در پژوهشی، تجمع Zn توسط آنالیزهای ICP-OES و EDX بر روی ریزجلبک *Haematococcus pluvialis* تحت تیمار نانوذرات ZnO تایید شد (۴۵) که مطابق با نتایج تحقیق حاضر است. هم‌چنین در گزارشی دیگر، تجمع عنصر کبالت توسط آنالیزهای ICP-OES و EDX بر روی برگ گیاه کلزا تحت تیمار ۴۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات اکسید کبالت تایید شد (۴۶).

در تحقیق حاضر، تغییرات ساختاری سلول‌های مزوفیلی برگ گیاه همیشه بهار تحت تاثیر تیمار نانوذرات  $CeO_2$  (۳۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در مقایسه با شاهد شامل به هم ریختگی و کاهش ضخامت بافت مزوفیل برگ، کاهش تعداد کلروپلاست‌ها در بافت مزوفیل برگ، کاهش ضخامت در پهنک برگ و دستجات آوندی مشاهده شد. در تحقیق حاضر، کاهش ضخامت بافت مزوفیل و پهنک برگ احتمالاً منجر به کاهش توزیع دی‌اکسید کربن و در نتیجه کاهش فتوسنتز که در نهایت منجر به کاهش رشد برگ می‌شود. هم‌چنین 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.

Yuan و همکاران (۴۷) بیان کردند که فشردگی و کاهش اندازه سلول‌های بافت مزوفیلی به علت کاهش رشد و توسعه سلولی می‌باشد. هم‌چنین Mousavi Kouhi و همکاران (۴۸،۳۱) گزارش کردند که کاهش فضای بین سلول‌های مزوفیلی باعث کاهش توزیع  $CO_2$  و کاهش فتوسنتز و رشد گیاه می‌شود. علاوه بر این Nhan و همکاران (۴۹) دریافتند که کاهش ضخامت دستجات

نانوذرات اکسید کبالت مشاهده شد (۳۵). رشد گیاهان تحت تاثیر انواع تنش‌های محیطی قرار می‌گیرد (۴۰-۳۶). سطح برگ بعنوان یکی از شاخص‌های رشد گیاه، نشان‌دهنده‌ی سلامت گیاه می‌باشد که تحت تاثیر تنش‌های محیطی قرار می‌گیرد (۳۵). در تحقیق حاضر، کاهش طول، عرض و سطح برگ احتمالاً باعث کاهش تعداد کلروپلاست‌ها و کاهش میزان کلروفیل و در نتیجه کاهش و اختلال در فتوسنتز می‌باشد که در نهایت منجر به کاهش رشد برگ می‌شود. در تحقیق حاضر، تجمع سربوم به روش ICP-OES در برگ همیشه بهار تحت تیمار با نانوذرات  $CeO_2$  مشاهده شد. بیشتر مطالعات قبلی بر روی در معرض قرار گرفتن نانوذرات با ریشه و یا بذر انجام شدند و مطالعات کمی بر روی جذب برگ‌های نانوذرات گزارش شدند (۴۱). در این تحقیق، به علت استفاده از روش اسپری برگ‌ها، برگ‌ها به طور مستقیم تحت تیمار با نانوذرات قرار گرفتند و در این روش، برگ‌ها بعنوان مهم‌ترین و حساس‌ترین بافت شناخته می‌شوند. در روش اسپری برگ‌ها، نانوذرات از طریق روزنه‌های هوایی برگ‌ها جذب می‌شوند و به بخش‌های مختلف گیاه انتقال می‌یابند و در نتیجه منجر به تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در گیاه می‌شوند (۴۲-۴۱). در پژوهشی بر روی گیاه خیار تحت اسپری برگ‌های نانوذرات  $CeO_2$  و  $CuO$ ، تجمع سربوم و مس گزارش شد (۱۸) که مشابه با نتایج تحقیق حاضر است. هم‌چنین در مطالعه‌ی دیگر، تجمع آهن در گیاه پرتقال (*Citrus maxima*) تحت اسپری برگ‌های نانوذرات  $Fe_3O_4$  گزارش شد (۴۳). در تحقیق دیگر، تجمع سربوم در گیاهان لوبیای تحت کاربرد برگ‌های نانوذرات سربا (۲۵۰ تا ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بطور قابل توجهی بیشتر از گیاهان لوبیای تحت کاربرد خاکی بودند و بیان شد که ویژگی‌های فیزیوشیمیایی خاک (اندازه ذرات، میزان ماده آلی، pH، پتانسیل ردوکس و غیره) باعث کاهش دسترسی زیستی نانوذرات و در نتیجه محدودیت جذب نانوذرات سربا از خاک به ریشه می‌شوند (۴۴). تحقیقات کمی در زمینه‌ی انتقال نانوذرات از بخش هوایی به ریشه وجود دارد. مطالعات بیان کردند که نانوذرات  $CeO_2$  می‌توانند از طریق آوند آبکش از ساقه به ریشه منتقل شوند. به خوبی مشخص شده است که سیستم انتقال آبکش مسئول حرکت مواد معدنی خاص و فتوسنتزی می‌باشد. مسیر انتقال از آبکش بسته به محل منبع و مخزن می‌تواند رو به بالا یا رو به پایین باشد. در نتیجه در طول نمو زایشی، نانوذرات  $CeO_2$  می‌توانند به بذرها و میوه‌ها منتقل شوند و وارد زنجیره غذایی



تحت تیمار با نانوذرات Fe از جمله افزایش ضخامت پهنک برگ و هم چنین افزایش ضخامت بافت مزوفیل برگ مشاهده شد (۴۷).

تغییرات آناتومیکی در سلول ها و بافت های برگ گیاهان تحت تنش های محیطی مشاهده می شوند (۵۴،۵۲،۴۶). بعنوان مثال در گزارشی، تنش ZnSO<sub>4</sub> (۳۵۰ میکرومول بر لیتر) بر روی گیاه کلزا، باعث کاهش تعداد و اندازه کلروپلاست ها شد. هم-چنین بی نظمی سلول های پارانشیمی و کاهش اندازه دستجات آوندی نیز مشاهده شد (۴۸). در تحقیقی دیگر در گیاه برنج تحت تیمار نانوذرات Ag (۱۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر)، تغییراتی در ساختار برگ از جمله کاهش اندازه ی سلول ها و تخریب آن ها مشاهده شد (۵۵).

اپیدرم برگ، دستجات آوندی، واکوئل، فضای بین سلولی و بافت کلانشیم بعنوان مکان های ذخیره و تجمع فلزات سنگین و نانوذرات در گیاهان گزارش شده است (۵۶،۴۷). در تحقیق حاضر، تغییرات فراساختاری سلول های مزوفیلی برگ گیاه همیشه بهار تحت تاثیر تیمار نانوذرات CeO<sub>2</sub> (۳۲۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر) در مقایسه با شاهد شامل کاهش تعداد کلروپلاست ها و متورم شدن آن ها، از هم پاشیدگی غشای سلولی، عبور نانوذرات از طریق پلاسمودسماتا در بین سلول ها، پراکسی زومه شدن سلول (افزایش تعداد پراکسی زوم ها در سلول) و هم چنین تجمع و رسوب نانوذرات در فضاهای بین سلولی و در بخش های مختلف سلول (واکوئل، استرومای کلروپلاست، پراکسی زوم، دیواره و غشا) مشاهده گردید. در تحقیق حاضر، از هم پاشیدگی غشای سلولی و تجمع نانوذرات در غشا احتمالاً منجر به افزایش نفوذپذیری و تراوایی غشا و در نتیجه افزایش نشت یونی و پراکسیداسیون لیپید در سلول می-شود. هم چنین در تحقیق حاضر، تجمع نانوذرات در استرومای کلروپلاست احتمالاً منجر به تولید بیش از حد ROS در کلروپلاست می شود و در نهایت منجر به کاهش فتوسنتز می شود. علاوه بر این در تحقیق حاضر، تجمع و رسوب نانوذرات در فضاهای بین سلولی و در سایر اندامک های سلول احتمالاً منجر به بیش تولید ROS می شود.

آوندی از طریق کاهش انتقال آب و یون های معدنی در گیاه منجر به کاهش فتوسنتز و رشد گیاه می شود. مطالعات نشان داده است که جذب و تجمع نانوذرات و فلزات سنگین در غلظت های بالا منجر به تغییرات ساختاری در گیاهان می شود. برگ ها در مقابل تنش ها حساس می باشند، اما در عین حال از مکانیسم هایی برای سازگاری با شرایط تنش-های محیطی نیز برخوردارند. پژوهش هایی در زمینه بررسی تاثیر نانوذرات و فلزات سنگین بر روی تغییرات ساختاری گیاهان انجام شده است، بعنوان مثال مطابق با نتایج تحقیق حاضر، در تحقیقی بر روی گیاه کلزای تحت تنش نانوذرات ZnO، تغییرات آناتومیکی از جمله کاهش ضخامت پهنک برگ، کاهش تعداد کلروپلاست ها، تغییر شکل در سلول های بافت مزوفیلی و آوندی و کاهش فضاهای بین سلولی مشاهده شد (۳۱). در گزارشی دیگر، کاهش تعداد سلول های مزوفیلی، کاهش فضاهای بین سلولی و بی نظمی بافت پارانشیمی در برگ گیاه خردل هندی تحت تنش Zn مشاهده شد (۵۰).

در مطالعه ای بر روی ساختار برگ و ریشه گیاه تنباکوی تحت تیمار نانوذرات نقره، تغییراتی از جمله سلول های ریشه واکوئله شده و تا حدی تخریب شده، هسته های تخریب شده در سلول های ریشه و پلاستیدهای بی نظم و کوچکتر شده در سلول های مزوفیلی برگ مشاهده شد (۵۱). هم چنین در پژوهشی دیگر، تغییرات ساختاری از جمله کاهش ضخامت پهنک برگ و کاهش ضخامت دستجات آوندی در برگ گیاه بابونه آلمانی تحت تنش سرب مشاهده شد (۵۲). در گزارشی بر روی ساختار برگ گیاه شبدردک (*Melilotus officinalis*) تحت تیمار مس، با افزایش غلظت مس، ضخامت در پهنک برگ و هم-چنین بافت مزوفیل برگ کاهش یافت (۵۳). در تحقیقی دیگر در برگ کلزای تحت غلظت ۴۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر نانوذرات اکسید کبالت، تغییراتی در ساختار برگ از جمله کاهش تعداد کلروپلاست ها در بافت مزوفیل برگ، افزایش ضخامت پهنک برگ، عدم تغییر ضخامت پارانشیم نردبانی، افزایش ضخامت پارانشیم اسفنجی و کاهش ضخامت دستجات آوندی مشاهده شد (۴۶). در پژوهشی دیگر، تغییرات آناتومیکی در برگ گیاه فلفل

بزرگ شدن و تجمع دانه های نشاسته، کاهش تعداد کلروپلاست ها و متورم شدن آن ها مشاهده شد و در نتیجه منجر به کاهش فتوسنتز، کلروز و تاخیر قابل توجهی در رشد گیاه شد (۲۱). در گزارش دیگری در پنبه ی تحت تنش ۵۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر نانوسریا، تصاویر TEM نشان داد که نانوذرات بیشتر به سطح خارجی کلروپلاست ها متصل شدند و هم چنین تغییراتی از جمله تورم، تخریب و تغییر شکل در کلروپلاست ها و تخریب غلاف های آوندی از طریق نانوذرات نیز مشاهده شد (۴۹). هم چنین رسوب و تجمع نانوذرات لانتانایوم در فضاهای بین سلولی و دیواره ی سلولی در سلول های ریشه ی گیاه خیار مشاهده شد (۶۰). در مطالعه ای دیگر در آراییدوپسیس در معرض تیمار ۳۰۰۰ میکرو-گرم بر میلی لیتر نانوسریا، رسوب و تجمع بالایی از نانوذرات در فضای بین سلولی و سیتوزول سلول های برگ مشاهده شد و تغییراتی از جمله افزایش ضخامت دیواره سلولی، کاهش اندازه کلروپلاست ها و کاهش اندازه دانه های نشاسته مشاهده شد (۵۷).

در گزارشی بیان شده است که نانوذرات CeO<sub>2</sub> بر اندامک های سلول برگ تاثیر می گذارند. در برگ های گیاهان در معرض نانوذرات CeO<sub>2</sub>، کلروپلاست ها متورم شده و هسته فشرده می شود و تیلاکوئیدها خمیده می شوند و نظم خود را از دست می دهند. چنین تغییراتی در کلروپلاست ها و تیلاکوئیدها، مکانیسم مهم مورد استفاده توسط گیاهان برای سازگاری به مشکلات ناشی از جذب نور و به منظور اجتناب از آسیب اضافی در برابر تنش می باشد و اختلال مهمی در اعمال متابولیکی این اندامک ها که منجر به کاهش ظرفیت فتوسنتزی می شود را پیشنهاد می کند (۶۱).

در تحقیقی، تجمع نانوسریا و نانوذرات TiO<sub>2</sub> در واکوئل سلول های پاراننشیمی و هم چنین میتوکندری های متورم شده در برگ گیاه جوی تحت غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم نانوذرات مشاهده شد (۶۲). در مطالعه ای دیگر، رسوب نانوذرات در سلول های پاراننشیم پوست در ریشه گیاه جوی تحت تیمار با غلظت ۲۰۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر نانوسریا مشاهده شد. هم-چنین در سلول های پاراننشیم برگی، رسوب کمتری از نانوذرات مشاهده شد

مطالعات مختلف گزارش کردند که پراکسیداسیون لیپید در گیاهان مختلف در پاسخ به نانوذرات اتفاق می افتد و تجمع مقادیر بالای مالون دی آلدئید و سایر آلدئیدها به معنی سطوح بالای آسیب سلولی می باشد (۵۴،۴۹،۲۹،۲۱). هم چنین گزارش شده است که در مقادیر زیاد نانوذرات، بیش تولید ROS صورت می گیرد و با مکانیسم اکسیداتیو همراه خواهد بود (۵۴). نانوذرات وارد شده به گیاه می تواند با زنجیره انتقال الکترون میتوکندری و کلروپلاست تداخل ایجاد کند و انفجار اکسیداتیو را به راه بی اندازه و در نهایت میزان ROS را افزایش دهد (۵۴،۴۹).

نتایج بدست آمده با نتایج بسیاری از مطالعات گذشته تطابق دارد (۵۷،۴۶،۴۱). به طور کلی نتایج نشان می دهد که تجمع و رسوب نانوذرات CeO<sub>2</sub> در غلظت بالا، روی ساختار اندامک های درون سلولی تاثیر دارد و می تواند با کاهش فتوسنتز و در نتیجه با کاهش رشد و عملکرد گیاه در ارتباط باشد (۴۶،۴۱). هم چنین نتایج نشان می دهد که چگونه این نانوذرات در غلظت بالا می توانند برای گیاه دارای سمیت باشند. با بررسی مطالعات مختلف مشاهده می شود که برهمکنش بین نانوذرات CeO<sub>2</sub> و گیاهان پیچیده است. تحقیقات نشان داده است که این نانوذرات دارای پتانسیلی برای تغییرات مورفو-فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی، آناتومیکی و فراساختاری گیاهان می باشند (۵۷-۵۸). بر طبق بررسی های صورت گرفته، نانوذرات CeO<sub>2</sub> در غلظت های بالا تاثیر مضر بر فیزیولوژی، متابولیسم و تولید محصول در گیاهان می گذارند (۵۹،۵۷،۱۶).

در پژوهشی در گیاه خیار تحت اسپری برگی با نانوذرات CeO<sub>2</sub> (۳۲۰ میکرو گرم بر میلی لیتر)، رسوب نانوذرات هم در برگ ها و هم در ریشه ها مشاهده شد. هم چنین تغییرات ناشی از سمیت نانوذرات در فراساختار برگ گیاه خیار شامل افزایش فضای واکوئلی در سلول های پاراننشیمی، کاهش تعداد کلروپلاست ها، کاهش تعداد دانه های نشاسته و تجمع نانوذرات در واکوئل بود (۴۱). در گزارشی دیگر بر روی تغییرات فراساختاری برگ گیاه ماش تحت غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر نانوذرات CeO<sub>2</sub>، نازک شدن دیواره سلولی،

واکول سلول های مزوفیلی برگ گیاهان همیشه بهار مشاهده شد. یکی از راهکارهایی که گیاهان برای تحمل فلزات سنگین و نانوذرات مورد استفاده قرار می دهند، به دام اندازی آن-ها در جایگاه های ویژه ای از بافت های برگ می باشد. این جایگاه ها بسته به نوع فلز و گونه ی گیاهی متغیر اند (۶۷). در تحقیقی در ارتباط با مکانیسم اثر سمیت نانوسریا (۵۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر) بر روی گیاه پنبه، نتایج بررسی های TEM نشان داد که کلروپلاست ها و غلاف های آوندی تخریب شدند و در نتیجه جذب برخی از یون ها از جمله روی، منیزیم و آهن کاهش یافت و این کاهش بر روی میزان سنتز کلروفیل و کاهش میزان فتوسنتز و در نتیجه کاهش رشد تاثیرگذار است (۴۹). اما در بررسی تاثیر نانوذرات  $CeO_2$  و نانوذرات اکسید تیتانیوم بر روی گیاه جو، نتایج TEM نشان داد که در هر دو تیمار، تجمعاتی از این نانوذرات در آوند چوبی و پارانشیم ریشه مشاهده می شوند. در حالی که اجزای سلول تحت تاثیر این تیمارها قرار نگرفتند و دچار تغییر نشدند و به نظر می رسد مکانیسم جذب نانوذرات اهمیت زیادی دارد و سمیت نانوذرات به ویژه در غلظت های بالا به نحوه ی جذب و تجمع شان در گیاهان و گونه گیاهی بستگی دارد (۶۸). در تحقیق حاضر، نتایج TEM تجمع و رسوب نانوذرات  $CeO_2$  را در برگ های همیشه بهار به وضوح نشان داد که این نتایج با نتایج حاصل از ICP-OES و EDX هم خوانی دارد.

ولی فراساختار کلروپلاست ها تحت تاثیر قرار نگرفت و آسیبی در کلروپلاست ها مشاهده نشد (۵۹). علاوه بر این، رسوب نانوذرات در سطح ریشه و فضای بین سلولی، سیتوپلاسم و واکول سلول های ریشه ی گیاه خیار تحت غلظت ۲۰۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر نانوسریا مشاهده شد (۶۳).

گزارشات متعددی نشان دهنده ی ورود نانوذرات به اندامک های سلولی و تاثیر بر اعمال آن ها می باشند (۶۲، ۶۱، ۵۷، ۵۴، ۴۹). در پژوهشی بر روی تغییرات فراساختاری برگ گیاه کلزای تحت تنش نانوذرات اکسید کبالت، کاهش تعداد کلروپلاست ها و متورم شدن آن ها، تجمع و رسوب نانوذرات در واکول و دیواره سلولی و هم چنین افزایش اندازه دانه های نشاسته در کلروپلاست ها مشاهده شد (۴۶). در تحقیقی دیگر بر روی برگ گیاه برنج تحت غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی-لیتر نانوذرات  $CuO$ ، کاهش تعداد تیلوکوئیدها در هر گرانوم و تیلوکوئیدهای متورم شده مشاهده شد (۶۴). در مطالعه ای دیگر بر روی سلول های ریشه ی گیاه گوجه فرنگی تحت غلظت ۲۰۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر نانوذرات  $NiO$ ، متراکم شدن هسته، افزایش تعداد پراکسیزوم ها و تخریب کریستای میتوکندری مشاهده شد (۶۵). در پژوهشی دیگر بر روی گیاه جوی تحت غلظت ۱۰۰۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر نانوذرات  $CuO$ ، کلروپلاست های متورم شده، کاهش تعداد و افزایش اندازه ی پلاستوگلوبول ها و دانه های نشاسته کمتر با اندازه بزرگ تر مشاهده شد (۶۶). در مطالعه ی حاضر تجمع نانوذرات  $CeO_2$  در دیواره سلولی و در

## نتیجه گیری:

در مجموع در تحقیق حاضر، تغییرات مورفولوژیکی از جمله کاهش طول، عرض و سطح برگ همیشه بهار تحت تیمار نانوذرات  $CeO_2$  مشاهده شد. هم چنین نتایج تجمع سریوم به روش ICP-OES و EDX هم راستا با نتایج TEM، نشان دهنده ی جذب و تجمع نانوذرات  $CeO_2$  در برگ گیاه همیشه بهار بود. علاوه بر این آسیب ها و تغییرات ساختاری (به هم ریختگی و کاهش ضخامت بافت مزوفیل برگ، کاهش تعداد کلروپلاست ها، کاهش ضخامت در پهنک برگ و دستجات آوندی) و فراساختاری (کاهش تعداد کلروپلاست ها و متورم شدن آن ها، پراکسیزومه شدن یا افزایش تعداد پراکسی زوم ها در سلول، از هم پاشیدگی غشای سلولی و تجمع و رسوب نانوذرات در فضاهای بین سلولی، دیواره و غشای سلولی، واکول، پراکسی زوم و استرومای کلروپلاست) بیانگر سمیت غلظت بالای نانوذرات  $CeO_2$  در سطح سلولی بود. در نتیجه، در این پژوهش بعلاوه کاهش فتوسنتز و رشد (به دلیل کاهش سطح برگ، کاهش تعداد کلروپلاست ها، کاهش ضخامت در بافت مزوفیل و دستجات آوندی برگ) و هم چنین سمیت حاصل از تجمع و رسوب نانوذرات  $CeO_2$  در بافت ها که احتمالاً منجر به بیش تولید ROS می-شود، در نهایت ممکن است باعث کاهش تعداد، کیفیت و عملکرد بذرهای همیشه بهار در مرحله زایشی شود. پیشنهاد می شود که در تحقیقات آینده تاثیر نانوذرات  $CeO_2$  در مرحله زایشی همیشه بهار نیز انجام شود. هم چنین به علت اهمیت گیاهان دارویی، اثرات خطرات احتمالی برهمکنش نانوذرات  $CeO_2$  با سایر گیاهان دارویی و محیط زیست باید در نظر گرفته شود.

**تقدیر و تشکر:**

از گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد و هم چنین از کارشناسان محترم بخش میکروسکوپ الکترونی و دستگاه ICP-OES آزمایشگاه مرکزی دانشگاه فردوسی مشهد و نیز کارشناس محترم دستگاه EDX پژوهشکده بوعلی- دانشگاه علوم پزشکی مشهد نهایت تشکر و قدردانی می گردد.

**تعارض منافع:**

نویسندگان اعلام می کنند که تعارض در منافع وجود ندارد.

**References**

- Murali M, Gowtham HG, Singh SB, Shilpa N, Aiyaz M, Alomary MN, Alshamrani M, Salawi A, Almoshari Y, Ansari MA, Amruthesh KN. Fate, bioaccumulation and toxicity of engineered nanomaterials in plants: Current challenges and future prospects. *Science of The Total Environment*. 2022; 811: 152249. DOI: **10.1016/j.scitotenv.2021.152249**
- Hu J, Xianyo Y. When nano meets plants: A review on the interplay between nanoparticles and plants. *Nano Today*. 2021; 38: 101143. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2021.101143>
- Siddiqui MH, Kalaji HM, Zhang Z, Ma X. Nanoparticles in environment and plant system: A boon or bane. *Chemosphere*. 2022; 308: 136320. DOI: **10.1016/j.chemosphere.2022.136320**
- Jahani M, Khavari-Nejad RA, Mahmoodzadeh H, Saadatmand S. Effects of foliar application of cobalt oxide nanoparticles on growth, photosynthetic pigments, oxidative indicators, non-enzymatic antioxidants and compatible osmolytes in canola (*Brassica napus* L.). *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*. 2019; 61(1): 29-42. DOI: **10.24425/abcsb.2019.127736**
- Ramos SJ, Dinali GS, Oliveira C, Martins GC, Moreira CG, Siqueira JO, Guilherme LRG. Rare earth elements in the soil environment. *Current Pollution Reports*. 2016; 2: 28-50. DOI: **10.1007/s40726-016-0026-4**
- Tommasi F, Thomas PJ, Pagano G, Perono GA, Oral R, Lyons DM, Toscanesi M, Trifuoggi M. Review of rare earth elements as fertilizers and feed additives: A knowledge gap analysis. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 2021; 81: 531-540. DOI: **10.1007/s00244-020-00773-4**
- Kovaríková M, Tomášková I, Soudek P. Rare earth elements in plants. *Biologia Plantarum*. 2019; 63: 20-32. DOI: **10.32615/bp.2019.003**
- Thomas PJ, Carpenter D, Boutin C, Allison JE. Rare earth elements (REEs): Effects on germination and growth of selected crop and native plant species. *Chemosphere*. 2014; 96: 57-66. DOI: **10.1016/j.chemosphere.2013.07.020**
- Arienzo M, Ferrara L, Trifuoggi M, Toscanesi M. Advances in the fate of rare earth elements, REE, in transitional environments: coasts and estuaries. *Water*. 2022; 14(3): 401. DOI: **10.3390/w14030401**
- Jahani M, Khavari-Nejad RA, Mahmoodzadeh H, Saadatmand S. Investigation of seed germination, early growth and physio-biochemical parameters of canola seedling exposed to Co3O4 engineered nanoparticles. *Journal of Chemical Health Risks*. 2022; 12(2): 237-246. DOI: **10.22034/jchr.2020.1891185.1092**
- Thakur N, Manna P, Das J. Synthesis and biomedical applications of nanocerium, a redox active nanoparticle. *Journal of Nanobiotechnology*. 2019; 17: 84. DOI: **10.1186/s12951-019-0516-9**
- Pansambal S, Oza R, Borgave S, Chauhan A, Bardapurkar P, Vyas S, Ghotekar S. Bioengineered cerium oxide (CeO2) nanoparticles and their diverse applications: a review. *Applied Nanoscience*. 2022; DOI: **10.1007/s13204-022-02574-8**
- Prakash V, Peralta-Videa J, Tripathi DK, Ma X, Sharma S. Recent insights into the impact, fate and transport of cerium oxide nanoparticles in the plant-soil continuum. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2021; 221: 112403. DOI: **10.1016/j.ecoenv.2021.112403**

14. Saifi MA, Seal S, Godugu C. Nanoceria, the versatile nanoparticles: Promising biomedical applications. *Journal of Controlled Release*. 2021; 338: 164-189. DOI: [10.1016/j.jconrel.2021.08.033](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.08.033)
15. Jahani S, Saadatmand S, Mahmoodzadeh H, Khavari-Nejad RA. Effect of foliar application of cerium oxide nanoparticles on growth, photosynthetic pigments, electrolyte leakage, compatible osmolytes and antioxidant enzymes activities of *Calendula officinalis* L.. *Biologia*. 2019; 74: 1063-1075. DOI: [10.2478/s11756-019-00239-6](https://doi.org/10.2478/s11756-019-00239-6)
16. Hussain I, Singh A, Singh NB, Singh A, Singh P. Plant-nanoceria interaction: Toxicity, accumulation, translocation and biotransformation. *South African Journal of Botany*. 2019; 121: 239-247. DOI: [10.1016/j.sajb.2018.11.013](https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.11.013)
17. Ma Y, He X, Zhang P, Zhang Z, Ding Y, Zhang J, Wang G, Xie C, Luo W, Zhang J, Zheng L, Chai Z, Yang K. Xylem and phloem based transport of CeO<sub>2</sub> nanoparticles in hydroponic cucumber plants. *Environmental Science & Technology*. 2017; 51(9): 5215-5221. DOI: [10.1021/acs.est.6b05998](https://doi.org/10.1021/acs.est.6b05998)
18. Ma YH, Kuang LL, He X, Bai W, Ding YY, Zhang Z, Zhao Y, Chai Z. Effects of rare earth oxide nanoparticles on root elongation of plants. *Chemosphere*. 2010; 78: 273-279. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2009.10.050](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.10.050)
19. Gui X, Zhang Z, Liu S, Ma Y, Zhang P, He X, Li Y, Zhang J, Li H, Rui Y, Liu L. Fate and phytotoxicity of CeO<sub>2</sub> nanoparticles on lettuce cultured in the potting soil environment. *PLoS One*. 2015; 10(8): e0134261. DOI: [10.1371/journal.pone.0134261](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134261)
20. Hong J, Wang L, Sun Y, Zhao L, Niu G, Tan W, Rico CM, Peralta-Videa JR, Gardea-Torresdey JL. Foliar applied nanoscale and microscale CeO<sub>2</sub> and CuO alter cucumber (*Cucumis sativus*) fruit quality. *Science of the Total Environment*. 2016; 563: 904-911. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2015.08.029](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.029)
21. Kamali-Andani N, Fallah S, Peralta-Videa JR, Golkar P. A comprehensive study of selenium and cerium oxide nanoparticles on mung bean: Individual and synergistic effect on photosynthesis pigments, antioxidants, and dry matter accumulation. *Science of The Total Environment*. 2022; 830: 154837. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2022.154837](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154837)
22. Singh A, Hussain I, Singh NB, Singh H. Uptake, translocation and impact of green synthesized nanoceria on growth and antioxidant enzymes activity of *Solanum lycopersicum* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2019; 182: 109410. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109410>
23. Salehi H, Chehregani Rad AK, Majd A, Gholami M. Effect of ZnO and CeO<sub>2</sub> nanoparticles on the element accumulation, growth and biochemical parameters in *Phaseolus vulgaris* L.. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*. 2019; 32(2): 390-405. DOI: [20.1001.1.23832592.1398.32.2.17.2](https://doi.org/10.1001.1.23832592.1398.32.2.17.2)
24. Paryan S, Ghorbanpour M, Hadian J. Influence of CeO<sub>2</sub>-nanoparticles on morpho-physiological traits and tanshinone contents of roots in *Salvia miltiorrhiza* Bunge upon foliar and soil application methods. *Journal of Medicinal Plants*. 2020; 19(75): 168-187. DOI: [10.29252/jmp.19.75.168](https://doi.org/10.29252/jmp.19.75.168)
25. Morales MI, Rico CM, Hernandez-Viezcas JA, Nunez JE, Barrios AC, Tafuya A, Flores-Marges JP, Peralta-Videa JR, Gardea-Torresdey JL. Toxicity assessment of cerium oxide nanoparticles in cilantro (*Coriandrum sativum* L.) plants grown in organic soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013; 61(26): 6224-6230. DOI: [10.1021/jf401628v](https://doi.org/10.1021/jf401628v)
26. Jahani S, Saadatmand S, Mahmoodzadeh H, Khavari-Nejad RA. Effects of cerium oxide nanoparticles on biochemical and oxidative parameters in marigold leaves. *Toxicological & Environmental Chemistry*. 2018; 100(8-10): 677-692. DOI: [10.1080/02772248.2019.1587443](https://doi.org/10.1080/02772248.2019.1587443)
27. Izadi Z, Mirazi N, Agha Alikhani M. Identification of marigold (*Calendula officinalis* L.) essence compositions and antioxidant effects with butyl hydroxy toluene in the stability of canola edible oil. *Armaghane Danesh Journal*. 2020; 25(5): 579-602. DOI: [10.52547/armaghanej.25.5.579](https://doi.org/10.52547/armaghanej.25.5.579)
28. Patil K, Sanjay CJ, Doggalli N, Renuka Devi KR, Harshitha N. A review of *Calendula officinalis*-magic in science. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2022; 16(2): 23-27. DOI: [10.7860/JCDR/2022/52195.16024](https://doi.org/10.7860/JCDR/2022/52195.16024)
29. Jahani S, Saadatmand S, Jahani M, Mahmoodzadeh H, Khavari-Nejad RA. Dose-dependent impacts of nano-sized ceria (CeO<sub>2</sub>) on seed germination, early growth and physiological parameters of marigold seedling. *Journal of Ornamental Plants*. 2022; 12(2): 101-114. DOI: [20.1001.1.22516433.2022.12.2.2.8](https://doi.org/10.1001.1.22516433.2022.12.2.2.8)



30. López-Moreno ML, la Rosa GD, Hernández-Viezcas JÁ, Castillo-Michel H, Botez CE, Peratta-Videa JR, Gardea-Torresdey JL. Evidence of the differential biotransformation and genotoxicity of ZnO and CeO<sub>2</sub> nanoparticles on soybean (*Glycine max*) plants. *Environmental Science & Technology*. 2010; 44(19): 7315. DOI: [10.1021/es903891g](https://doi.org/10.1021/es903891g)
31. Mousavi Kouhi SM, Lahouti M, Ganjeali A, Entezari MH. Long-term exposure of rapeseed (*Brassica napus* L.) to ZnO nanoparticles: anatomical and ultrastructural responses. *Environmental Science and Pollution Research*. 2015; 22(14): 10733-10743. DOI: [10.1007/s11356-015-4306-0](https://doi.org/10.1007/s11356-015-4306-0)
32. Fathi Z, Khavari-Nejad RA, Mahmoodzadeh H, Nejad-Sattari T. Investigating of ultrastructure and histology leaf and root of castor seeds (*Ricinus communis* L.) under concentrations of multi-walled carbon nanotubes. *Developmental Biology*. 2018; 10(2):1-10. [https://jdb.ntb.iau.ir/article\\_541805.html?lang=en](https://jdb.ntb.iau.ir/article_541805.html?lang=en)
33. Aleya L, Abdel-Daim MM. Advances in nanotechnology, nanopollution, nanotoxicology, and nanomedicine. *Environmental Science and Pollution Research*. 2020; 27: 18963-18965. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08800-6>
34. Yan A, Chen Z. Detection methods of nanoparticles in plant tissues. In Özge Çelik, *New visions in plant science*. London, UK: IntechOpen. 2018; DOI: [10.5772/intechopen.74101](https://doi.org/10.5772/intechopen.74101).
35. Jahani M, Khavari-Nejad RA, Mahmoodzadeh H, Saadatmand S. Effects of cobalt oxide nanoparticles (Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs) on ion leakage, total phenol, antioxidant enzymes activities and cobalt accumulation in *Brassica napus* L. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 2020; 48(3): 1260-1275. DOI: <https://doi.org/10.15835/nbha48311766>
36. Mareri L, Parrotta L, Cai, G. Environmental stress and plants. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23(10): 5416. DOI: [10.3390/ijms23105416](https://doi.org/10.3390/ijms23105416)
37. Jahani S, Lahouti M, Jahani M. Investigation Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> interaction on biomass and enzymes activity of peroxidase and polyphenol oxidase in leaf of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Crop Physiology Journal*. 2014; 5(20): 15-24. <http://cpj.ahvaz.iau.ir/article-1-186-en.html>
38. Jahani M, Hadi MR, Jafarinia M, Jahani S. Investigating the effect of calcium on growth, oxidative indices, ascorbate, glutathione and antioxidant enzymes activity in triticale (*x Triticosecale Wittmack*) under salt stress. *Iranian Journal of Biological Sciences*. 2022; (In press).
39. Ranjan A, Rajput VD, Minkina T, Bauer T, Chauhan A, Jindal T. Nanoparticles induced stress and toxicity in plants. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*. 2021; 15: 100457. DOI: [10.1016/j.enmm.2021.100457](https://doi.org/10.1016/j.enmm.2021.100457)
40. Jahani M, Hadi MR, Jafarinia M, Jahani S. Impact of calcium supplementation on photosynthetic pigments, compatible osmolytes contents and membrane stability index in triticale (*x Triticosecale Wittmack*) exposed to salinity stress. *Journal of Chemical Health Risks*. 2021; DOI: [10.22034/jchr.2021.1901194.1141](https://doi.org/10.22034/jchr.2021.1901194.1141)
41. Hong J, Peratta-Videa JR, Rico C, Sahi S, Viveros MN, Bartonjo J, Zhao L, Gardea-Torresdey JL. Evidence of translocation and physiological impacts of foliar applied CeO<sub>2</sub> nanoparticles on cucumber (*Cucumis sativus*) plants. *Environmental Science and Technology*. 2014; 48(8): 4376-4385. <https://doi.org/10.1021/es404931g>
42. Hong J, Wang C, Wagner DC, Gardea-Torresdey JL, He F, Rico CM. Foliar application of nanoparticles: mechanisms of absorption, transfer, and multiple impacts. *Environmental Science: Nano*. 2021; 8: 1196-1210. <https://doi.org/10.1039/DOEN01129K>
43. Hu J, Guo H, Li J, Wang Y, Xiao L, Xing B. Interaction of Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles with *Citrus maxima* leaves and the corresponding physiological effects via foliar application. 2017; *Journal of Nanobiotechnology*. 15: 51. <https://doi.org/10.1186/s12951-017-0286-1>
44. Salehi H, Chehregani A, Lucini L, Majd A, Gholami M. Morphological, proteomic and metabolomic insight into the effect of cerium dioxide nanoparticles to *Phaseolus vulgaris* L. under soil or foliar application. *Science of The Total Environment*. 2018; 616-617: 1540-1551. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2017.10.159](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.159)
45. Djearamane S, Lim YM, Wong LS, Lee PF. Cellular accumulation and cytotoxic effects of zinc oxide nanoparticles in microalga *Haematococcus*



- pluvialis. PeerJ. 2019; 7: e7582. DOI: 10.7717/peerj.7582
46. Jahani M, Khavari-Nejad RA, Mahmoodzadeh H, Saadatmand S. Investigation of structural and ultrastructural changes of canola (*Brassica napus* L.) leaves under cobalt oxide nanoparticles treatment. Iranian Journal of Biological Sciences. 2021; 16(3): 69-85. <https://dori.net/dor/20.1001.1.22516433.2022.12.2.2.8>
47. Yuan J, Chen Y, Li H, Lu J, Zhao H, Liu M, Nechitaylo GS, Glushchenko NN. New insights into the cellular responses to iron nanoparticles in *Capsicum annuum*. Scientific Reports. 2018; 8(1): 3228. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18055-w>
48. Mousavi Kouhi SM, Lahouti M, Ganjeali A, Entezari MH. Anatomical and ultrastructural responses of *Brassica napus* after long-term exposure to excess zinc. Turkish Journal of Biology. 2016; 40: 652-660. DOI: 10.3906/biy-1411-13
49. Nhan LV, Ma C, Rui Y, Liu S, Li X, Xing B, Liu L. Phytotoxic mechanism of nanoparticles: Destruction of chloroplasts and vascular bundles and alteration of nutrient absorption. Scientific Reports. 2015; 5: 11618. <https://doi.org/10.1038/srep11618>
50. Sridhar MBB, Diehl SV, Han FX, Monts DL, Su Y. Anatomical changes due to uptake and accumulation of Zn and Cd in Indian mustard (*Brassica juncea*). Environmental and Experimental Botany. 2005; 54(2): 131-141. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2004.06.011>
51. Cvjetko P, Zovko M, Štefanić PP, Biba R, Tkalec M, Domijan AM, Vrčec IV, Letofsky-Papst I, Šikić S, Balen B. Phytotoxic effects of silver nanoparticles in tobacco plants. Environmental Science and Pollution Research. 2018; 25(6): 5590-5602. DOI: 10.1007/s11356-017-0928-8
52. Sadari SZ, Zarrinkamar F. Effect of different concentrations of lead on anatomical structure of *Matricaria chamomilla* L. in different developmental stages. Environmental Stresses in Crop Sciences. 2011; 3(2): 139-149. DOI: 10.22077/escs.2011.90
53. Habibvash F, Daneshgar M, Sadeghi A. Investigating the effects of copper sulfate on the germination characteristics and anatomical structures of *Melilotus officinalis* L. Journal of Rangeland. 2017; 11(3): 389-404. DOI: 20.1001.1.20080891.1396.11.3.11.2
54. Rajput VD, Minkina T, Sushkova S, Mandzhieva S, Fedorenko A, Lysenko V, Bederska-Błaszczak M, Olchowik J, Tsitsuashvili V, Chaplygin V. Structural and ultrastructural changes in nanoparticle exposed plants. In: Pudake R, Chauhan N, Kole C. (eds.). Nanoscience for Sustainable Agriculture. Springer, Cham. 2019; [https://doi.org/10.1007/978-3-319-97852-9\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-319-97852-9_13)
55. Thuesombat P, Hannongbua S, Akasit S, Chadchawan S. Effect of silver nanoparticles on rice (*Oryza sativa* L. cv. KDML 105) seed germination and seedling growth. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2014; 104: 302-309. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.03.022
56. Vollenweider P, Cosio C, Günthardt-Georg M, Keller C. 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. 2006; 58(1-3): 25-40. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.06.012>
57. Yang X, Pan H, Wang P, Zhao FJ. Particle-specific toxicity and bioavailability of cerium oxide (CeO<sub>2</sub>) nanoparticles to *Arabidopsis thaliana*. Journal of Hazardous Materials. 2017; 322: 292-300. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2016.03.054
58. Barrios AC, Rico CM, Trujillo-Reyes J, Medina-Velo IA, Peralta-Videa JR, Gardea-Torresdey JL. Effects of uncoated and citric acid coated cerium oxide nanoparticles, bulk cerium oxide, cerium acetate, and citric acid on tomato plants. Science of The Total Environment. 2016; 563-564: 956-964. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2015.11.143
59. Mattiello A, Pošćić F, Fellet G, Zavalloni C, Fontana M, Piani B, Vischi M, Miceli F, Masetti R, Marchiol L. Engineered nanomaterials and crops: Physiology and growth of barley as affected by nanoscale cerium oxide. Italian Journal of Agronomy. 2016; 11(3): 149-157. DOI: 10.4081/ija.2016.725
60. Ma Y, He X, Zhang P, Zhang Z, Guo Z, Tai R, Xu Z, Zhang L, Ding Y, Zhao Y, Chai Z. Phytotoxicity and biotransformation of La<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles in a terrestrial plant cucumber (*Cucumis sativus*). Nanotoxicology. 2011; 5: 743-753. <https://doi.org/10.3109/17435390.2010.545487>
61. Du W, Gardea-Torresdey JL, Ji R, Yin Y, Zhu J, Peralta-Videa JR, Guo H. Physiological

and biochemical changes imposed by CeO<sub>2</sub> nanoparticles on wheat: A life cycle field study. *Environmental Science and Technology*. 2015; 49(19): 11884-11893. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03055>

62. 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. DOI: 10.3390/ijerph13030332

63. Ma Y, Zhang P, Zhang Z, He X, Li Y, Zhang J, Zheng L, Chu S, Yang K, Zhao Y, Chai Z. Origin of the different phytotoxicity and biotransformation of cerium and lanthanum oxide nanoparticles in cucumber. *Nanotoxicology*. 2015; 9(2): 262-270. DOI: 10.3109/17435390.2014.921344

64. Da Costa M, Sharma P. Effect of copper oxide nanoparticles on growth, morphology, photosynthesis, and antioxidant response in *Oryza sativa*. *Photosynthetica*. 2016; 54: 110-119. <https://doi.org/10.1007/s11099-015-0167-5>

65. Faisal M, Saquib Q, Alatar AA, Al-Khedhairi AA, Hegazy AK, Musarrat J. Phytotoxic hazards of NiO-

nanoparticles in tomato: a study on mechanism of cell death. *Journal of Hazardous Materials*. 2013; 250: 318-332. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2013.01.063

66. Rajput VD, Minkina T, Fedorenko A, Mandzhieva S, Sushkova S, Lysenko V, Duplii N, Azarov A, Vasily A. Destructive effect of copper oxide nanoparticles on ultrastructure of chloroplast, plastoglobules and starch grains in spring barley (*Hordeum sativum*). *International Journal of Agriculture and Biology*. 2018; 21(1): 171-174. DOI: 10.17957/IJAB/15.0877

67. Todeschini V, Lingua G, D'Agostino G, Carniato F, Roccotiello E, Berta G. Effects of high Zn concentration on poplar leaves: a morphological and biochemical study. *Environmental and Experimental Botany*. 2011; 71(1): 50-56. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.10.018>

68. Mattiello A, Filippi A, Pošćić F, Musetti R, Salvatici MC, Giordano C, Vischi M, Bertolini A, Marchiol L. Evidence of phytotoxicity and genotoxicity in *Hordeum vulgare* L. exposed to CeO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Frontiers in Plant Science*. 2015; 25(6): 1043. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01043>