

## بررسی امکان سنتز سبز نانوذرات آهن با تفاله موم زنبور عسل و تاثیر آن بر همیشه بهار تحت تنش سرب

نسبیه پورقاسمیان<sup>۱،۲\*</sup>، سارا عابدینی<sup>۳</sup>، روح اله مرادی<sup>۴</sup>

۱. دانشیار، گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی بردسیر، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران
۲. گروه پژوهشی کشت و فراوری زعفران و گل محمدی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران
۳. دانش‌آموخته دکتری، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران
۴. دانشیار، گروه تولیدات گیاهی، دانشگاه تربت حیدریه، تربت حیدریه، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۲/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۵/۰۱

### چکیده

پژوهش حاضر به منظور بررسی امکان سنتز سبز نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی (IONPs) در حضور عصاره آبی و اتانولی تفاله موم زنبور عسل (Beeswax waste, Bw) به عنوان یکی از ضایعات کشاورزی و ارزیابی تاثیر نانوذرات IONPs سنتز شده به واسطه Bw (Bw-IONPs) در مقایسه با نانوذرات شیمیایی (Ch-IONPs) بر گیاه همیشه بهار در شرایط تنش سرب طراحی و اجرا شد. در ادامه مطالعه، آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در محیط هیدروپونیک انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل دو سطح سرب (صفر و ۳۰۰ میلی گرم در لیتر) و سه شکل مختلف آهن (سولفات آهن به عنوان شاهد، Ch-، Bw-IONPs، IONPs) در سه تکرار بود. نتایج نشان داد، وزن خشک بخش هوایی، ریشه، کلروفیل a، کلروفیل کل و پروتئین تحت تنش سرب به ترتیب حدود ۴۶، ۴۱، ۴۴ و ۳۳ درصد کاهش و با مصرف نانوذرات، مخصوصاً نانوذره Bw-IONPs به ترتیب حدود ۲۰، ۳۹، ۲۷ و ۱۴ درصد افزایش یافتند. با این حال فنل، فلاونوئید و آنتوسیانین در شرایط تنش سرب، افزایش یافتند و با مصرف آهن به شکل نانوذره مخصوصاً نانوذره Bw-IONPs، افزایش بیشتری نشان دادند. ترکیبات فوق، در نقش آنتی اکسیدانی برای گیاه ظاهر شدند. برتری نانوذره Bw-IONPs نسبت به بقیه اشکال آهن در شرایط تنش می تواند بیانگر امکان استفاده از نانوذرات سنتز شده به روش سبز در توسعه روش های کشاورزی پایدار و حفاظت از منابع طبیعی بوده و راهکارهای جدیدی برای مقابله با مشکلات ناشی از آلودگی خاک و تنش های زیست محیطی ارائه دهد.

**کلیدواژگان:** آنتوسیانین، فلزات سنگین، فلاونوئید، نانوذرات، هیدروپونیک

## مقدمه

سرب، به دلیل تجمع زیستی و تجزیه‌ناپذیری، می‌تواند خاک و آب را آلوده کرده و تهدیدی جدی برای جانوران، گیاهان و انسان باشد (Gülser & Arzu, 2020). سرب اثر قوی بر گیاهان دارد زیرا می‌تواند بر تمام جنبه‌های رشد و سلامت گیاه تأثیر بگذارد. علاوه بر این، فلز مذکور بر متابولیسم گیاهان نیز تأثیر می‌گذارد به عنوان مثال، کاهش فعالیت فتوسنتزی، محتوای پروتئین، جذب مواد مغذی، میزان تنفس و محتوای ATP یا افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و استرس اکسیداتیو را موجب می‌شود (Fryzova et al., 2018). تولید رادیکال‌های آزاد ناشی از سمیت سرب می‌تواند منجر به استرس اکسیداتیو گردد، که به طور گسترده به عنوان یک شاخص تنش محیطی برای گیاه شناخته و ممکن است منجر به مرگ سلولی شود (Haghighi & Kafi, 2014). از این رو اتخاذ اقدامات پیشگیرانه برای سم‌زدایی خاک‌ها و آب‌های آلوده به سرب ضروری است.

نانوتکنولوژی یک حوزه نوظهور است که پتانسیل بسیار زیادی برای ارائه راه حل‌های نوآورانه برای طیف وسیعی از مشکلات زیست محیطی دارد و هدف اصلی آن در حیطه محیط زیست، طراحی ایمن نانومواد با مزایای زیست محیطی و ارتقای توسعه پایدار این مواد است (Rizwan et al., 2021). نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی (IONPs) می‌توانند با آلاینده‌های موجود در خاک و آب مانند فلزات سنگین، آفت‌کش‌ها و سایر آلاینده‌ها برهمکنش داشته باشند (Mounier et al., 2023). همچنین نانو مواد می‌توانند راه حل امیدوارکننده‌ای برای پاکسازی آلاینده‌ها و حذف آن‌ها از زنجیره غذایی و ممانعت از رسیدن آنها به انسان باشند (Zhang et al., 2020). نانوذرات به دلیل نسبت سطح به حجم بالا، می‌توانند بر تحرک، دسترس پذیری و سمیت فلزات سنگین تأثیر بگذارند. بنابراین، IONPs به طور موثر فلزات سنگین را از بین می‌برند و انتقال آنها را از طریق مکانیسم‌های مختلف مانند احیا فلز و به دنبال آن تأثیر در کاهش جذب، محدود می‌کنند (Jamali-Behnam et al., 2018). برای مثال، ژانگ و همکاران (۲۰۲۰) گزارش کردند که افزایش جذب مس (Cu) به IONPs با افزایش pH مرتبط است، که باعث کاهش پروتون در سطح نانوذره می‌شود و به جذب کاتیون کمک می‌کند (Zhang et al., 2020). در پژوهشی دیگر افزودن IONPs به طور قابل

توجهی روی محلول در خاک را تا ۲۲ درصد کاهش داد (Mahanty et al., 2020).

مطالعات نشان دادند که نانوذرات می‌توانند ظرفیت گیاه را برای جذب بیشتر مواد مغذی افزایش دهند این تغییرات از طریق تأثیر بر پی اچ محیط و تأثیرات بیولوژیکی بر رشد گیاه مانند تحریک ترشحات ریشه از طریق بیان ژن تأثیر می‌گذارند (Dimkpa et al., 2015; Mahanty et al., 2020). تحقیقات فعلی در ارتباط با استفاده از IONPs برای کاهش سمیت ناشی از فلزات سنگین سمی و بهبود رشد گیاه تأکید دارند. بنابراین، IONPs را می‌توان در ترکیب با توان گیاه‌پالایی گیاهانی مانند گیاه همیشه‌بهار (*Calendula officinalis*) برای اصلاح خاک‌های آلوده به فلزات سنگین استفاده کرد (de França Bettencourt et al., 2020; Samani et al., 2024). همیشه بهار (*Calendula officinalis*) به عنوان یک گیاه دارویی زینتی ارزشمند و با داشتن توانایی بالایی آن در جذب، تثبیت و تجمع غلظت‌های مختلف سرب، پتانسیل بالایی گیاه‌پالایی و تولید زیست توده مناسب محسوب می‌شود (Liu et al., 2010).

در پژوهش‌های قبلی گزارش شد عصاره تفاله موم زنبور عسل اثرات مثبت و قابل توجهی بر گیاهان دارد و کاربردهای امیدوارکننده‌ای برای آن مشاهده شد (Pourghasemian et al., 2018; Pourghasemian et al., 2020). تاکنون گزارشی از سنتز سبز نانوذرات IONPs توسط تفاله موم زنبور عسل مشاهده نشده است. همچنین با توجه به اینکه مواد خارج شده از تفاله موم زنبور عسل تحت تأثیر حلال‌های مورد استفاده قرار می‌گیرند. بنابراین به نظر می‌رسد که آب و الکل هر یک مواد متفاوتی را از این ماده خارج کرده و روی سنتز سبز نانوذرات IONPs تأثیر می‌گذارند. لذا یکی از اهداف این مطالعه بررسی امکان سنتز سبز نانوذره آهن مغناطیسی با عصاره آبی و الکلی تفاله موم زنبور عسل است. هدف دوم از این مطالعه تأثیر نانوذرات IONPs سنتز شده به روش سبز (Bw-IONPs) بر گیاه همیشه‌بهار تحت شرایط تنش فلز سنگین سرب در مقایسه با نانوذرات IONPs سنتز شده به روش شیمیایی (Ch-IONPs) است.

## مواد و روش‌ها

## سنتز سبز Bw-IONPs

تفاله موم زنبور عسل از استان اصفهان تهیه شد. به هر گرم تفاله موم زنبور عسل ده میلی لیتر حلال (آب یا اتانول ۹۵ درصد) اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در شیکرانکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد. پس از حذف بقایای اضافی، عصاره حاصل در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. جهت سنتز نانوذرات Bw-IONPs، محلول  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  و  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  با نسبت مولی ۱:۱/۵ (۱ mM)  $(26/6:41/1)$  تهیه شد. پس از تقریباً دو ساعت که دما به ۸۰ درجه سانتی گراد رسید ضمن ثابت نگه داشتن دما مقدار ۵۰ میلی گرم بر لیتر از عصاره آبی یا اتانولی تفاله موم زنبور عسل به محلول اضافه شد و پس از چند دقیقه توسط سود ۵ مولار pH مخلوط واکنش به ۱۰ تا ۱۱ رسانیده شد. جهت شستشو نانوذره حاصل پنج بار با آب دیونیزه سانتریفیوژ شد (Abedini et al., 2024).

## تعیین ویژگی‌های نانوذرات Bw-IONPs

طیف‌سنجی مرئی-فرا بنفش (UV-visible spectroscopy)، طیف (Uv-Vis) در طیف ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر انجام شد. طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوری (Fourier-transform infrared spectroscopy, FTIR) در محدوده طیفی بین ۵۰۰ تا ۳۵۰۰  $\text{cm}^{-1}$  مورد بررسی قرار گرفت. علاوه بر این تجزیه و تحلیل‌های تفرق نور پویا (Dynamic light scattering, DLS)، اشعه ایکس پراکنده انرژی (Energy Dispersive X-ray, EDX)، میکروسکوپ الکترونی روبشی (scanning electron microscopy, SEM) با وضوح بالا و پراش پرتو ایکس (X-ray diffraction, XRD) انجام شد.

## شرایط رشد گیاه، اعمال تیمار و ارزیابی صفات

## بیوشیمیایی

بذور گیاه همیشه بهار از پاکان بذر اصفهان و نانوذرات Ch-IONPs (کد محصول US3230) از شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان خریداری شد. همچنین نانو ذرات Bw-IONPs سنتز شده به روش سبز در قسمت اول این مطالعه تهیه شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در محیط هیدروپونیک و تیمارهای آزمایش شامل دو سطح

سرب ( $300 \text{ mg.L}^{-1}$  و ۰) و سه شکل مختلف آهن (سولفات آهن به عنوان شاهد و Bw-IONPs و Ch-IONPs با غلظت  $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) در سه تکرار انجام شد (Golkari et al., 2023). با توجه به اینکه در کشت هیدروپونیک با محلول غذایی هوگلند (ادب آوازه و همکاران، ۱۴۰۰)، معمولاً از ترکیب سولفات آهن استفاده می‌شود، این ترکیب به عنوان تیمار شاهد در نظر گرفته شد. بذور پس از ضدعفونی سطحی توسط هیپوکلریت یک درصد، به منظور جوانه زنی بر روی کاغذ صافی مرطوب نگهداری شدند. ۴ بذر جوانه زده و همگن به گلدان‌های ۱۰۰۰ میلی لیتری حاوی محلول هوگلند ۵۰ درصد انتقال داده شد (Adabavazeh et al., 2022). گیاهچه‌ها در اتاقک رشد در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت خاموشی رشد کردند که نور توسط لامپ‌های فلورسنت سفید با شدت نور  $90 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  تامین شد (Osram Sylvania, Versailles, KY) (Adabavazeh et al., 2022). پس از آنکه گیاهچه‌ها به مرحله دو برگگی رسیدند، تنش سرب در محلول هوگلند اعمال گردید. همچنین به طور همزمان تیمارهای Bw-IONPs و Ch-IONPs با غلظت  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  به هوگلند اضافه و به مدت سه هفته برای آبیاری استفاده شدند. بعد از اتمام آزمایش، بوته‌ها با آب مقطر شسته شدند و به دو بخش هوایی و ریشه تقسیم شدند. سپس بخش هوایی دو عدد از بوته‌ها جهت اندازه‌گیری صفات بیوشیمیایی مورد نظر، استفاده شدند. دو بوته دیگر در آون با دمای ۷۰ درجه سانتیگراد قرار داده شدند و سپس به کمک ترازو برای تعیین وزن خشک ریشه و بخش هوایی مورد استفاده قرار گرفتند.

**ارزیابی میزان کلروفیل:** ۲۰۰ میلی گرم از بافت گیاهی در پنج میلی لیتر استون ۸۰٪ سائیده شد. پس از جدا نمودن بقایای گیاهی، حجم محلول به ۱۵ میلی لیتر رسانده شد. خوانش جذب نمونه‌ها در طول موج  $663/3$  و  $646/8$  نانومتر انجام شد (Sheikhbahaie et al., 2020).

$\text{Chlorophyll a } (\mu\text{g/ml}) = (12.25 * \text{absorbance in } 663.2 \text{ nm}) - (2.79 * \text{absorbance in } 646.8 \text{ nm})$   
 $\text{Chlorophyll b } (\mu\text{g/ml}) = (21.5 * \text{absorbance in } 646.8 \text{ nm}) - (5.7 * \text{absorbance in } 663.2 \text{ nm})$

**محتوی آنتوسیانین:** عصاره‌گیری از ۱۰۰ میلی گرم بافت گیاهی توسط ۱۰ میلی لیتر HCl یک درصد انجام شد.

سرد به دو میلی لیتر از بافر فسفات اضافه شد. پس از سائیدن بافت گیاهی بقایای اضافی حذف شد و محلول حاصل برای ارزیابی پروتئین کل مورد استفاده قرار گرفت. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانش شد. برای رسم منحنی استاندارد جهت محاسبه غلظت پروتئین محلول کل از غلظت‌های ۱۰۰-۲۰ میلی گرم بر لیتر آلبومین سرم گاوی (ABS، ۶۶/۲ KDa) استفاده شد (Adabavazeh et al., 2023).

**ارزیابی پرولین:** ۳۰۰ میلی گرم بافت گیاهی در شرایط کاملاً سرد توسط ۱۰ میلی لیتر سولفوسالسیلیک اسید به خوبی سائیده شد. پس از حذف بقایای گیاهی به دو میلی لیتر از محلول حاصل دو میلی لیتر معرف نین هیدرین و دو میلی لیتر استیک اسید خالص اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۴۵ تا ۶۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس، چهار میلی لیتر تولوئن اضافه شد و پس از دو فاز شدن محلول از فاز بالایی جهت خوانش جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۲۰ نانومتر استفاده شد (Adabavazeh et al., 2023).

### آنالیزهای آماری

به منظور ثبت و نگهداری داده‌های حاصل از آزمایش از نرم افزار Excel 2016 استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها به صورت تجزیه واریانس (ANOVA)، مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن ( $P > 0.005$ ) توسط نرم افزار SAS انجام شد.

### نتایج و بحث

**سنتز سبز و تعیین خصوصیات نانوذرات Bw-IONPs**  
تغییر رنگ محلول نمک‌های آهن به همراه Bw به سیاه، سنتز نانوذرات Bw-IONPs را تایید کرد. طبق مطالعات قبلی، تشکیل نانوذرات IONPs همزمان با تغییر رنگ نمک‌های آهن به سیاه است (Sharma et al., 2023). Bw-IONPs سنتز شده به واسطه عصاره اتانولی تفاله موم زنبور عسل مدت خیلی کوتاهی پس از سنتز آلوده شده و ناپایدار بود. حتی پس از پراکنده‌سازی توسط دستگاه التراسونیک نیز سریعاً به صورت مجتمع در می‌آمدند. در حالی که Bw-IONPs سنتز شده به واسطه عصاره آبی تفاله موم زنبور عسل پس از مدت چندین ماه نیز به صورت پایدار بود و

مخلوط حاصل یک شب در تاریکی و دمای اتاق نگهداری شد. سپس سانتریفیوژ شد و از مایع رویی برای خوانش جذب در طول موج ۵۵۰ نانومتر استفاده شد (Sheikhbahaei et al., 2020).

$$A = \epsilon bc \quad (A = \text{absorbance } c = \text{concentration } b = \text{cuvette width} = 1 \text{ cm } \epsilon = 33000 \text{ cm}^{-1} \text{ mol})$$

**محتوی فنل و فلاونوئید:** ۲۰۰ میلی گرم بافت تازه با چهار میلی لیتر متانول ۸۰٪ سائیده شد. پس از حذف بقایای گیاهی عصاره حاصل برای سنجش محتوی فنل و فلاونوئید استفاده شد (Sheikhbahaei et al., 2020). ۲۰۰ میکرولیتر عصاره و ۱۵۰۰ میکرولیتر معرف فولین باهم مخلوط شدند و در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد ۱۵۰۰ میکرولیتر بی-کربنات سدیم با غلظت ۶۰ میلی گرم بر میلی لیتر اضافه شد. خوانش جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۲۵ نانومتر انجام شد. برای رسم منحنی استاندارد نیز جهت محاسبه غلظت فنل کل از غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر اسید گالیک استفاده شد. مقدار ۵۰۰ میکرولیتر عصاره گیاهی، ۱۰۰ میکرولیتر کلرید آلومینیوم (۱۰٪ متانول)، ۱۰۰ میکرولیتر سدیم هیدروکسید با غلظت یک مولار و در نهایت ۲۸۰۰ میکرولیتر آب مقطر با هم مخلوط شدند و به مدت نیم ساعت در دمای اتاق نگهداری شدند. خوانش جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۳۰ نانومتر انجام شد. برای رسم منحنی استاندارد نیز جهت محاسبه غلظت فلاونوئید کل از غلظت‌های ۲۵-۲۵۰ میکروگرم بر لیتر کوئرستین متانولی استفاده شد.

### ارزیابی مالون دی‌آلدئید (MDA, Malondialdehyde):

در شرایط کاملاً سرد ۲۰۰ میلی گرم بافت گیاهی توسط سه میلی لیتر TCA ۱۰٪ سائیده شد و سپس سانتریفیوژ شد. مایع رویی جمع‌آوری شد و دو میلی لیتر TCA ۲۰٪ حاوی ۵٪ تیوباربیتوریک اسید اضافه شد و جذب نمونه‌ها در دو طول موج ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر خوانش شد (Sheikhbahaei et al., 2020).

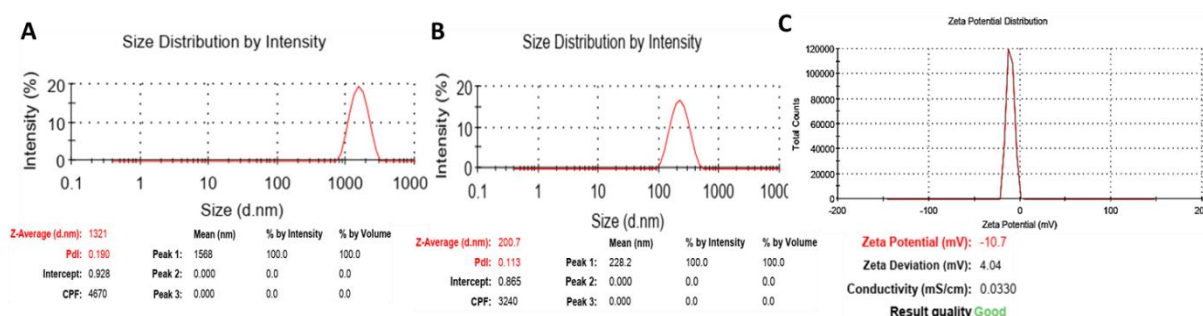
$$\Delta\text{MDA} (\text{nmol g}^{-1} \text{ FW}) = [(A532-A600)/155000] \times 106$$

$$\text{OD} = A532-A600, \epsilon = 155000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

**ارزیابی پروتئین:** از روش برادفور برای ارزیابی پروتئین کل استفاده شد. بافر فسفات یا بافر استخراج (۲/۵ میلی مولار، pH: ۷/۸) تهیه شد. ۱۰۰ میلی گرم از بافت گیاهی در شرایط

عصاره اتانولی و آبی متفاوت می‌باشد احتمالاً می‌تواند بر سنتز و پایداری نانوذرات تاثیر بگذارد. بنابراین Bw-IONPs سنتز شده به واسطه عصاره آبی برای ادامه پژوهش انتخاب شد.

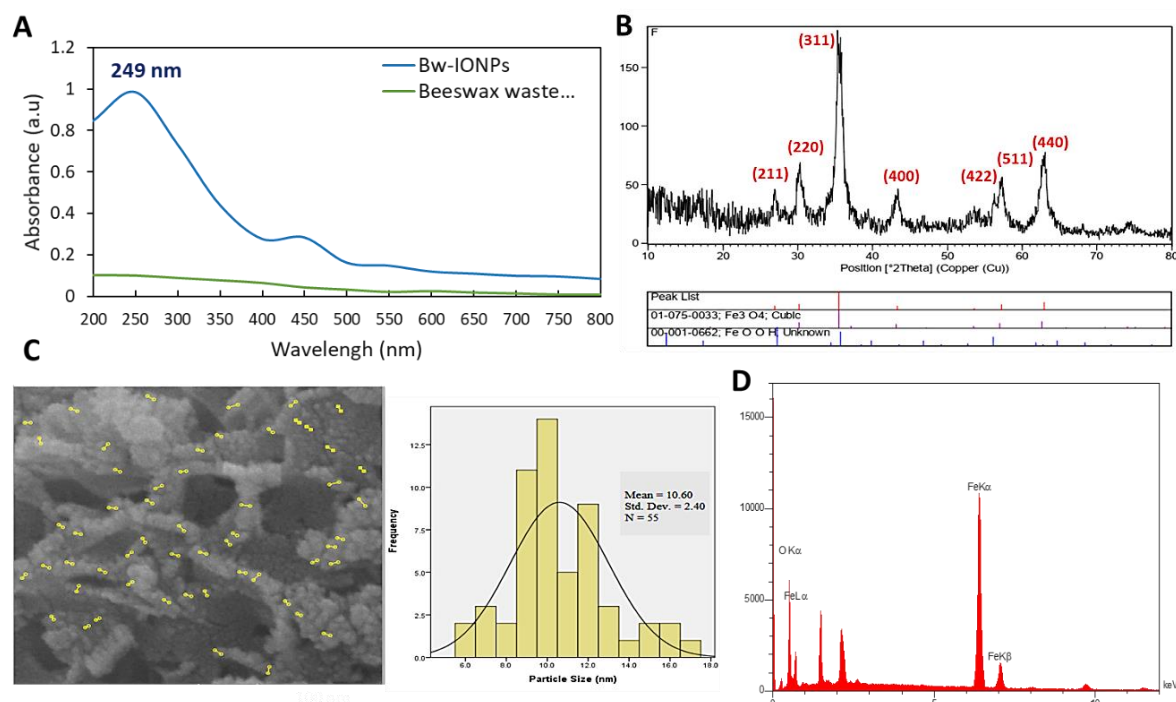
تجمع ذرات دیده نشد. همچنین، آنالیز DLS قطر هیدرودینامیکی بسیار بزرگتری برای Bw-IONPs سنتز شده به واسطه عصاره اتانولی تفاله موم زنبور عسل (۱۳۲۱ نانومتر) نسبت به نانوذرات حاصل از عصاره آبی (۲۰۰/۷ نانومتر) نشان داد (شکل ۱A و ۱B). از آنجایی که ماهیت



شکل ۱- (A) نتایج حاصل از DLS نانوذرات IONPs سنتز شده توسط عصاره اتانولی تفاله موم زنبور عسل، (B) نتایج حاصل از DLS و (C) پتانسیل زتا نانوذرات IONPs سنتز شده توسط عصاره آبی تفاله موم زنبور عسل

دیگر، مانند سباستیان و همکاران (۲۰۱۸) و خان و همکاران (۲۰۲۲) با نتایج موجود در سنتز نانوذرات Bw-IONPs مطابقت دارند که پیک‌های قوی را به ترتیب در طول موج‌های ۲۴۰ و ۲۴۵ نانومتر گزارش کردند (Sebastian et al., 2018; Khan et al., 2022).

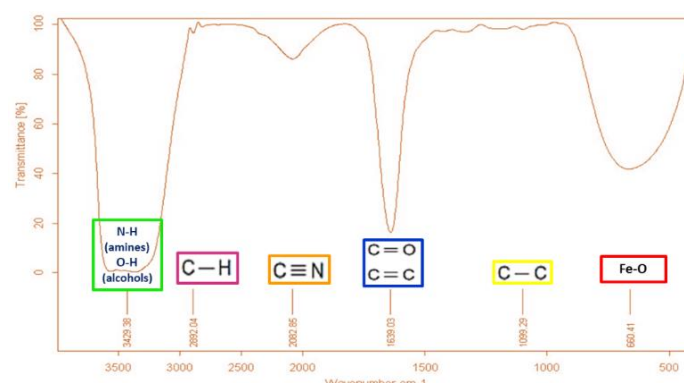
نانوذرات Bw-IONPs سنتز شده با عصاره آبی تفاله موم زنبور عسل با مقدار بار منفی سطحی یعنی  $-10.7$  میلی ولت کاملاً پایدار بود (شکل ۱C) و طیف UV-Vis نیز حداکثر جذب Bw-IONPs در طول موج حدود ۲۴۹ نانومتر را نشان داد (شکل ۲A). مطالعات



شکل ۲- (A) طیف UV-Vis، (B) الگوی XRD، (C) تصویر میکروسکوپی و هیستوگرام سایز IONPs و (D) طیف آنالیز EDX نانوذرات IONPs سنتز شده توسط عصاره آبی تفاله موم زنبور عسل

این داده‌ها نشان می‌دهد که ماهیت نانوذرات سنتز شده با گروه‌های عاملی  $C\equiv N$ ،  $C=O$ ،  $C-C$ ،  $N-H$ ،  $O-H$ ،  $C-H$ ،  $C=C$  مربوط است. طیف FTIR پیک پهنی را در  $1600\text{ cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاشات کششی پیوند  $Fe-O$  در ساختار نانوذرات Bw-IONPs می‌توان نسبت داد (شکل ۳). یافته‌های FTIR با مطالعات سایر پژوهشگران مطابقت داشت (Mohapatra et al., 2015; Winiarczyk et al., 2021). فیتوکمیکال‌ها حاوی رادیکال‌های آنیونی هستند که می‌توانند نمک‌های آهن  $Fe^{+2}$  و  $Fe^{+3}$  را به نانوذرات IONPs کاهش دهند. اگر مخلوط واکنش قلیایی باشد، مقدار  $OH^-$  عموماً زیاد است و جاذبه قابل توجهی بین  $Fe^+$  و  $OH^-$  ایجاد می‌کند که منجر به افزایش تبلور و تولید نانوذرات IONPs کوچک‌تر می‌شود (Sebastian et al., 2018).

الگوی XRD پیک‌های مشخصی را در زوایای  $2\theta = 26.9^\circ$ ،  $30.2^\circ$ ،  $35.5^\circ$ ،  $43.3^\circ$ ،  $53.6^\circ$ ،  $57.2^\circ$  نشان داد (شکل ۲B). داده‌های حاصل از XRD ماهیت کریستالی و خلوص نانوذرات Bw-IONPs را نشان داد (Venugopal et al., 2020). تصاویر SEM نشان داد که نانوذرات Bw-IONPs به شکل کروی، با قطری از ۶ نانومتر تا ۱۸ نانومتر و با میانگین  $10.6\text{ nm}$  نانومتر بودند (شکل ۲C). اجزای عنصری و فراوانی نسبی از EDX همانطور که در شکل ارائه شده است به دست آمد (شکل ۲D). طیف EDX خلوص و ترکیب شیمیایی کامل نانوذرات Bw-IONPs را نشان داد. اندازه ذرات و شکل نانوذرات Bw-IONPs بیوسنتز شده با مطالعات دیگر مشابه است (Win et al., 2021; Tombuloglu et al., 2022; Ndou et al., 2023). طیف FTIR پیک‌های مشخص در  $1600\text{ cm}^{-1}$  و  $1099\text{ cm}^{-1}$ ،  $1639\text{ cm}^{-1}$ ،  $2082\text{ cm}^{-1}$ ،  $2892\text{ cm}^{-1}$ ،  $3429\text{ cm}^{-1}$  نشان داد.



شکل ۳- تجزیه و تحلیل گروه‌های عاملی توسط طیف FTIR نانوذرات Bw-IONPs سنتز شده توسط عصاره آبی تفاله موم زنبور عسل

تعدیل نماید. در شرایط عدم تنش، هر دو ترکیب-Ch-IONPs (۰/۱۹۳ گرم در بوته) و Bw-IONPs (۰/۱۹۲ گرم در بوته) به‌طور قابل توجهی نسبت به تیمار سولفات آهن (۰/۱۸۲ گرم در بوته)، وزن خشک ریشه را افزایش دادند، بدون آنکه اختلاف معنی‌داری بین این دو ترکیب مشاهده شود. (جدول ۱). در شرایط تنش سرب، بین هر سه ترکیب آهن اختلاف معنی‌داری وجود داشت. به‌طوری‌که، بیشترین وزن خشک ریشه (۰/۱۴۰ گرم در بوته) با کاربرد Bw-IONPs حاصل شد که نسبت به سولفات آهن و ترکیب Ch-IONPs به ترتیب منجر به بهبود ۲۴ و ۹ درصدی این شاخص شد.

وزن خشک ریشه و بخش هوایی به‌عنوان برآیندی از پاسخ-های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه در مواجهه با تنش سرب مورد بررسی قرار گرفت. مطالعه حاضر نشان داد که Bw-IONPs وزن خشک ریشه و بخش هوایی را بیش از بقیه تیمارهای آهن افزایش داد، این افزایش در شرایط تنش سرب، بیش از شرایط عدم تنش بود. به نظر می‌رسد که نانوذرات Bw-IONPs به دلیل ویژگی‌های فیزیکی، به‌ویژه اندازه و سطح ویژه، در کاهش اثرات تنش سرب نسبت به نانوذرات IONPs سنتز شده به روش شیمیایی مؤثرتر عمل کرده‌اند. (Irshad et al., 2021). نانوذرات سبز آهن در تحریک آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی در شرایط تنش و عدم تنش نقش بیشتری ایفا کردند (جدول ۲) همین مسئله می‌تواند یکی از دلایل افزایش وزن خشک گیاه همیشه بهار باشد. همچنین مطالعات نشان داده‌اند که نانوذرات می‌توانند بر ضخامت اپیدرمیس اثر گذاشته و سبب کاهش جذب عناصر سنگین شوند، این مسئله می‌تواند یکی

### تاثیر Ch-IONPs و Bw-IONPs بر پارامترهای رشدی

#### گیاه همیشه بهار

**وزن خشک اندام هوایی و ریشه:** نتایج نشان داد تاثیر تنش سرب و نوع ترکیبات آهن در سطح احتمال یک درصد و برهمکنش آنها در سطح احتمال پنج درصد بر وزن خشک ریشه معنی‌دار بود (جدول ۱). در تمام ترکیبات آهن، میزان وزن خشک گیاه تحت تاثیر تنش سرب نسبت به عدم تنش کاهش قابل توجهی یافت. کاهش وزن خشک در تیمار سولفات آهن (شاهد) نسبت به تیمارهای نانوذرات IONPs بیشتر بود بطوری‌که، تنش سرب در تیمارهای شاهد، مصرف Ch-IONPs و Bw-IONPs به ترتیب منجر به کاهش حدود ۴۶، ۳۸ و ۲۵ درصدی این شاخص نسبت به شرایط عدم تنش این تیمارها شد. در هر دو سطح تنش و عدم تنش، محلول‌پاشی هردو شکل IONPs منجر به بهبود معنی‌دار وزن خشک گیاه نسبت به سولفات آهن شد (جدول ۱). در شرایط عدم تنش سرب، اختلاف معنی‌داری بین وزن خشک اندام هوایی در تیمارهای Ch-IONPs (۰/۹۴ گرم در بوته) و Bw-IONPs (۰/۹۷ گرم در بوته) مشاهده نشد. ولی، در زمان تنش سرب، میزان این شاخص در ترکیب Bw-IONPs (۰/۷۲۸ گرم در بوته) به‌طور معنی-داری بیشتر از ترکیب Ch-IONPs (۰/۵۸ گرم در بوته) بود. کاهش وزن خشک ریشه تحت تاثیر تنش سرب در تیمارهای شاهد، Ch-IONPs و Bw-IONPs به ترتیب حدود ۴۱، ۳۰ و ۲۳ درصد نسبت به تیمار ترکیب سولفات آهن (۰/۱۸۲ گرم در بوته) بود. به‌عبارتی، مصرف نانوذرات IONPs به‌ویژه شکل سنتز شده به روش سبز آن توانست کاهش وزن ریشه گیاه همیشه بهار را تحت تاثیر تنش سرب

از دلایل افزایش وزن خشک در شرایط تنش و در حضور نانوذرات مخصوصا نانوذرات سبز باشد (Mazaheri Tirani *et al.*, 2019). دلیل دیگری که می‌توان برای این افزایش وزن خشک گیاه همیشه‌بهار در شرایط تنش و در حضور نانوذرات متصور شد، امکان تشکیل کمپلکس‌های فلزی نانوذرات با فلزات سنگین است که از این طریق سمیت آن‌ها کاهش می‌یابد. در مطالعه‌ای که روی تاثیر نانوذرات سیلیکون در حضور فلزات سنگین مانند کروم (Cr) و آرسنیک (As) انجام شد، مشخص گردید که این نانوذرات می‌توانند با فلزات سنگین مذکور کمپلکس تشکیل داده و از جذب آن‌ها توسط گیاه جلوگیری کنند (Cui *et al.*, 2020).

### محتوی کلروفیل

**کلروفیل a:** میزان این شاخص در سطح احتمال یک درصد تحت تاثیر تنش سرب و اشکال آهن و در سطح احتمال پنج درصد تحت تاثیر برهمکنش این دو عامل قرار گرفت (جدول ۱). در کلیه ترکیبات کود آهن، محتوی کلروفیل a در شرایط عدم تنش بیشتر از تنش سرب بود (جدول ۱). در تیمار عدم تنش، تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مصرف سولفات آهن (۱۱/۱۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) و Ch-IONPs (۱۳/۸۷ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) مشاهده نشد. اما اختلاف این شاخص در تیمار شاهد با ترکیب Bw-IONPs (۱/۵۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) معنی‌دار بود. در شرایط تنش سرب، کاربرد هردو شکل نانوذرات IONPs منجر به افزایش معنی‌دار کلروفیل a نسبت به کاربرد سولفات آهن شد. مصرف Ch-IONPs و Bw-IONPs به ترتیب میزان کلروفیل a را نسبت به شاهد، به ترتیب حدود ۴۱ و ۷۹ درصد بهبود بخشید.

**کلروفیل b:** فاکتورهای تنش سرب و ترکیبات آهن، میزان کلروفیل b را در سطح احتمال یک درصد تحت تاثیر قرار دادند ولی این شاخص تحت تاثیر برهمکنش این دو عامل قرار نگرفت (جدول ۱). نتایج نشان داد که به‌طور میانگین تنش سرب محتوی کلروفیل b را نسبت به تیمار عدم تنش حدود ۳۳ درصد کاهش داد. در بین تیمارهای کودی، مصرف Bw-IONPs و Ch-IONPs به ترتیب با ۳/۳۸ و ۳/۳۰ میلی‌گرم بر گرم وزن تر به‌طور معنی‌داری از محتوی کلروفیل b بالاتری نسبت به تیمار مصرف سولفات آهن برخوردار بودند.

**محتوی کلروفیل کل:** تنش سرب و ترکیبات آهن در سطح احتمال یک درصد و برهمکنش آن‌ها در سطح احتمال پنج درصد این شاخص را تحت تاثیر قرار دادند (جدول ۱). در تمامی تیمارهای ترکیب آهن، محتوی کلروفیل کل با اعمال تنش سرب به‌طور قابل توجهی کاهش یافتند. به‌طوری‌که، تنش سرب در تیمارهای شاهد، Ch-IONPs و Bw-IONPs به ترتیب باعث کاهش ۳۳، ۲۹ و ۲۳ درصدی این شاخص نسبت به شرایط عدم تنش شد (جدول ۱). در شرایط عدم تنش سرب، اختلاف معنی‌داری بین تیمار شاهد (۱۸/۲۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) و Ch-IONPs (۲۱/۷۶) وجود نداشت. اما تیمار مصرف Bw-IONPs با محتوی کلروفیل کل ۲۳/۲۲ میلی‌گرم بر گرم وزن تر به‌طور معنی‌داری باعث افزایش ۲۷ درصدی محتوی کلروفیل نسبت به مصرف سولفات آهن شد. در زمان اعمال تنش سرب، بین هرسه ترکیب آهن اختلاف معنی‌داری از نظر محتوی کلروفیل کل وجود داشت و مصرف هر دو ترکیب Ch-IONPs و IONPs منجر به بهبود معنی‌داری این شاخص نسبت به شاهد شدند که تاثیر Bw-IONPs در این خصوص بیشتر بود.

جدول ۱ - نتایج تجزیه واریانس (میانگین مربعات) تیمارهای مورد بررسی بر صفات مورد مطالعه

| منابع تغییر    | درجه  | وزن خشک   | وزن خشک  | کلروفیل a | کلروفیل b           | کلروفیل کل | کارتنوئید           | فلاونوئید | آنتوسیانین | فنل کل | MDA    | پرولین | پروتئین |
|----------------|-------|-----------|----------|-----------|---------------------|------------|---------------------|-----------|------------|--------|--------|--------|---------|
|                | آزادی | بخش هوایی | ریشه     |           |                     |            |                     |           |            |        |        |        |         |
| تنش سرب (a)    | ۱     | ۰/۴۷۵**   | ۰/۰۱۸**  | ۱۰۵/۲**   | ۶/۶۲**              | ۱۵۹/۲**    | ۰/۰۴۵ <sup>ns</sup> | ۱۲/۶۵**   | ۰/۵۵۲**    | ۲۵۴۵** | ۴۴۷۲** | ۱۹۳۸** | ۹۵/۰۸*  |
| عنصر آهن (b)   | ۲     | ۰/۰۷۷**   | ۰/۰۰۰۷** | ۳۲/۶۳**   | ۱/۴۵**              | ۴۲/۲۲**    | ۰/۱۲۲ <sup>ns</sup> | ۰/۱۵۳*    | ۰/۰۶۶**    | ۶۹۵**  | ۷۷/۲۹* | ۱۱۵**  | ۱۴۴**   |
| a×b            | ۲     | ۰/۰۷*     | ۰/۰۰۰۲*  | ۶/۱۵*     | ۰/۰۸۴ <sup>ns</sup> | ۵/۳۸**     | ۰/۰۱۷ <sup>ns</sup> | ۰/۶۱۷**   | ۰/۰۳۴**    | ۱۱۶**  | ۶۳/۵۴* | ۴۴**   | ۱۰۶/۷*  |
| اشتباه آزمایشی | ۱۲    | ۰/۰۰۱۴    | ۰/۰۰۰۰۴  | ۰/۷۲۵     | ۰/۱۰۴               | ۰/۸۸۳      | ۰/۱۱۶               | ۰/۰۴۳     | ۰/۰۰۱      | ۱۸/۵۹  | ۱۷/۴۵  | ۰/۸۶۹  | ۱۹/۸۷   |
| ضریب تغییرات % | -     | ۶/۰۴      | ۴/۲۸     | ۷/۶۵      | ۱۰/۵۷               | ۵/۱۹       | ۸/۶۸                | ۸/۶۹      | ۷/۳۱       | ۸/۲۰   | ۱۲/۳۳  | ۵/۱۲   | ۱۰/۱۶   |

\*\* : معنی دار در سطح ۱٪؛ \* : معنی دار در سطح ۵٪ و <sup>ns</sup> : عدم معنی داری

هر دو نانوذرات Bw-IONPs و Ch-IONPs سبب افزایش میزان کلروفیل a و کلروفیل کل و کاهش پرولین در شرایط تنش و عدم تنش شدند، از آنجایی که پیش ماده ساخت کلروفیل و پرولین، گلوتامات است و تغییر سرنوشت گلوتامات به کلروفیل یا پرولین به تغییر در میزان آنزیم‌های سازنده این دو ماده بر می‌گردد (Jalili Marandi, 2009)، به نظر می‌رسد در مطالعه حاضر، نانوذرات IONPs گلوتامات را بیشتر در مسیر سنتز کلروفیل هدایت کرده‌اند.

**MDA:** محتوی MDA به‌طور معنی‌داری تحت تاثیر تیمارهای تنش سرب، محلولپاشی کود و نوع ترکیبات آهن آنها قرار گرفت (جدول ۱). تنش سرب محتوی MDA را در کلیه تیمارهای اشکال آهن به‌طور چشم‌گیری نسبت به شرایط عدم تنش سرب افزایش داد (جدول ۱).

جدول ۲- مقایسه میانگین تأثیر برهمکنش تنش سرب × عنصر آهن بر صفات مورد مطالعه

| تنش سرب                                                  |                    | عدم تنش سرب        |                    | تنش سرب            |                    | صفات                |
|----------------------------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| شاهد                                                     | عنصر آهن           | شاهد               | عنصر آهن           | شاهد               | عنصر آهن           |                     |
|                                                          | Ch-IONPs           | Bw-IONPs           |                    | Ch-IONPs           | Bw-IONPs           |                     |
| وزن خشک بخش هوایی (گرم در بوته)                          | ۰/۴۳۷ <sup>c</sup> | ۰/۷۲۸ <sup>a</sup> | ۰/۵۸۰ <sup>b</sup> | ۰/۸۱۰ <sup>b</sup> | ۰/۹۷۰ <sup>a</sup> | ۰/۹۴۰ <sup>a</sup>  |
| وزن خشک ریشه (گرم در بوته)                               | ۰/۱۰۷ <sup>c</sup> | ۰/۱۴۰ <sup>a</sup> | ۰/۱۲۷ <sup>b</sup> | ۰/۱۸۳ <sup>b</sup> | ۰/۱۹۲ <sup>a</sup> | ۰/۱۹۳ <sup>a</sup>  |
| کلروفیل a (میلی گرم بر گرم وزن تر)                       | ۶/۲۱ <sup>c</sup>  | ۱۱/۱۱ <sup>a</sup> | ۸/۸۰ <sup>b</sup>  | ۱۱/۱۸ <sup>a</sup> | ۱۵/۵۸ <sup>b</sup> | ۱۳/۸۷ <sup>ab</sup> |
| کلروفیل b (میلی گرم بر گرم وزن تر)                       | ۱/۸۵ <sup>a</sup>  | ۲/۹۰ <sup>a</sup>  | ۲/۶۰ <sup>a</sup>  | ۳/۱۳ <sup>a</sup>  | ۳/۸۵ <sup>a</sup>  | ۴/۰۱ <sup>a</sup>   |
| کلروفیل کل (میلی گرم بر گرم وزن تر)                      | ۱۲/۲۵ <sup>c</sup> | ۱۷/۸۱ <sup>a</sup> | ۱۵/۳۵ <sup>b</sup> | ۱۸/۲۸ <sup>b</sup> | ۲۳/۲۲ <sup>a</sup> | ۲۱/۷۶ <sup>ab</sup> |
| کاروتنوئید (میلی گرم بر گرم وزن تر)                      | ۴/۱۹ <sup>a</sup>  | ۳/۸۰ <sup>a</sup>  | ۳/۹۵ <sup>a</sup>  | ۳/۹۷ <sup>a</sup>  | ۳/۷۹ <sup>a</sup>  | ۳/۸۸ <sup>a</sup>   |
| فلاونوئید (میلی گرم بر گرم وزن تر)                       | ۲/۸۹ <sup>b</sup>  | ۳/۷۸ <sup>a</sup>  | ۳/۰۲ <sup>b</sup>  | ۱/۳۷ <sup>b</sup>  | ۱/۶۷ <sup>a</sup>  | ۱/۶۲ <sup>a</sup>   |
| میکروگرم بر میلی لیتر آنتوسیانین (میکروگرم بر میلی لیتر) | ۰/۴۹ <sup>c</sup>  | ۰/۸۴ <sup>a</sup>  | ۰/۶۱ <sup>b</sup>  | ۰/۳۳ <sup>a</sup>  | ۰/۲۷ <sup>b</sup>  | ۰/۳۰ <sup>ab</sup>  |
| فنل کل (میکروگرم بر میلی لیتر)                           | ۵۱/۹۸ <sup>c</sup> | ۸۱/۲۴ <sup>a</sup> | ۶۰/۲۱ <sup>b</sup> | ۳۶/۵۸ <sup>b</sup> | ۴۸/۲۵ <sup>a</sup> | ۳۷/۲۵ <sup>b</sup>  |
| مالون دی آلدئید (میکروگرم بر میلی لیتر)                  | ۵۷/۳۹ <sup>a</sup> | ۴۴/۶۵ <sup>b</sup> | ۴۶/۸۵ <sup>b</sup> | ۱۸/۳۶ <sup>a</sup> | ۱۷/۲۵ <sup>a</sup> | ۱۸/۷۰ <sup>a</sup>  |
| پرولین (میکرومول بر گرم وزن تر)                          | ۳۶/۱۳ <sup>a</sup> | ۲۲/۳۱ <sup>c</sup> | ۲۷/۳۲ <sup>b</sup> | ۱۰/۱۲ <sup>a</sup> | ۷/۱۳ <sup>b</sup>  | ۶/۲۵ <sup>b</sup>   |
| پروتئین (میلی گرم بر گرم وزن تر)                         | ۳۵/۶۲ <sup>b</sup> | ۴۹/۱۷ <sup>a</sup> | ۳۹/۸۸ <sup>b</sup> | ۴۲/۱۱ <sup>b</sup> | ۴۸/۱۵ <sup>a</sup> | ۴۸/۲۰ <sup>a</sup>  |

میانگین‌های دارای حروف مشترک اختلاف معنی‌داری بر اساس روش برش دهی در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن ندارند.

### محتوی فنول، فلاونوئید، آنتوسیانین و کارتنوئید

**محتوی فنول:** اثرات ساده و متقابل تنش سرب و ترکیبات آهن محتوی فنول را در سطح احتمال یک درصد تحت تاثیر قرار داد (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین تنش و اشکال آهن نشان داد که در کلیه ترکیبات کودی، محتوی فنول در شرایط تنش سرب به میزان قابل توجهی بیشتر از شرایط عدم تنش بود (جدول ۱). بطوریکه، تنش سرب به ترتیب باعث افزایش ۴۲، ۶۱ و ۶۸ درصدی میزان این شاخص در تیمارهای مصرف سولفات آهن، Ch-IONPs و Bw-IONPs نسبت به عدم تنش شد. به عبارتی، مصرف نانوذرات IONPs به‌ویژه نانوذرات Bw-IONPs آن تولید فنول در زمان تنش را تحریک نمودند. در شرایط عدم تنش، اختلافی بین تیمارهای سولفات آهن (۳۶/۵) ماکروگرم بر میلی‌لیتر و Ch-IONPs (۳۷/۲۵) از نظر محتوی فنول وجود نداشت ولی مصرف Bw-IONPs بطور معنی‌داری محتوی فنول بیشتری (۴۸/۲۵) از این دو تیمار را شامل شد (جدول ۱). در شرایط تنش سرب، مصرف هردو نانوذرات Bw-IONPs و Ch-IONPs منجر به تحریک معنی‌دار تولید فنول نسبت به مصرف سولفات آهن شدند. مصرف Ch-IONPs (۶۰/۲۱) ماکروگرم بر میلی‌لیتر و Bw-IONPs (۸۱/۲۴) ماکروگرم بر میلی‌لیتر) به ترتیب محتوی فنول را نسبت به مصرف سولفات آهن (۵۱/۹۸) ماکروگرم بر میلی‌لیتر) به ترتیب حدود ۱۶ و ۵۶ درصد بهبود بخشید.

**محتوی فلاونوئید:** نتایج تجزیه واریانس نشان داد تاثیر تنش سرب ( $p \leq 0.01$ )، ترکیبات آهن ( $p \leq 0.05$ ) و اثر متقابل این دو تیمار ( $p \leq 0.01$ ) بر محتوی فلاونوئید معنی‌دار بود (جدول ۱). نتایج تایید نمود که تنش سرب محتوی فلاونوئید را به میزان چشم‌گیری نسبت به شرایط عدم تنش افزایش داد (جدول ۱). بطوریکه، میزان این شاخص در انواع مختلف ترکیبات آهن در زمان عدم تنش بین ۱/۳۷ تا ۱/۶۷ و در زمان تنش سرب بین ۲/۸۹ تا ۳/۷۸ متغیر بود. در شرایط عدم تنش، محتوی فنول در زمان مصرف کود Ch-IONPs (۱/۶۲) ماکروگرم بر میلی‌لیتر و Bw-IONPs (۱/۶۷) ماکروگرم بر میلی‌لیتر) بدون اختلاف معنی‌دار با یکدیگر به‌طور معنی‌داری کمتر از تیمار مصرف سولفات آهن (۱/۳۷) ماکروگرم بر میلی‌لیتر) بود. اما در شرایط تنش سرب، بیشترین محتوی فنول (۳/۸۷) ماکروگرم

این افزایش محتوی MDA تحت تاثیر تنش سرب نسبت به عدم تنش، برای تیمار شاهد، Ch-IONPs و Bw-IONPs به ترتیب حدود ۲۱۳، ۱۵۰، ۱۵۸ درصد بود. در شرایط عدم تنش، محتوی MDA بین دامنه ۱۸/۷۰ تا ۱۷/۲۵ میکرومول بر گرم وزن تر متغیر بود و اختلافی بین اشکال آهن از این نظر وجود نداشت (جدول ۱). در شرایط تنش سرب، تیمار بدون سولفات آهن بیشترین میزان MDA را با مقدار ۵۷/۳۹ میکرومول بر گرم وزن تر نشان داد و مصرف Ch-IONPs و Bw-IONPs به‌طور معنی‌داری منجر به کاهش محتوی MDA شدند. اختلاف معنی‌داری بین کاربرد Ch-IONPs (۴۶/۸۵) و Bw-IONPs (۴۴/۶۵) از نظر محتوی MDA وجود نداشت. مالون دی‌آلدئید به‌عنوان معیاری از پراکسیداسیون لیپیدها و آسیب به غشا (Fryzova et al., 2018)، نشان داد که تنش سرب میزان این فاکتور را به‌طور قابل توجهی افزایش می‌دهد. در شرایط تنش، استفاده از هر دو نانوذرات Bw-IONPs و Ch-IONPs بدون تفاوت معنی‌دار با یکدیگر، سبب کاهش مالون دی‌آلدئید شدند. این مسئله گویای نقش نانوذرات IONPs در کاهش تنش اکسیداتیو سرب بود. نانوذرات به دلیل اندازه کوچکشان می‌توانند به غشا و دیواره سلولی نفوذ کرده و وارد اپیدرم، آوند چوبی، استوانه مرکزی و برگ‌ها شوند این مسئله سبب افزایش رشد سلولی و تحریک تولید رنگیزه‌های فتوسنتزی می‌شود. همچنین نانو ذرات می‌توانند به عنوان پیام رسان‌های خارجی عمل کرده و گیاهان را به تولید آنتی‌اکسیدان‌ها تحریک کنند. این مسئله سبب محافظت از گیاه و کاهش آسیب پذیری غشا، کاهش پراکسیداسیون لیپیدها و مالون دی‌آلدئید می‌گردد (Usman et al., 2020). همچنین جذب بهتر آهن و رشد بیشتر گیاه خود عاملی در ایجاد مقاومت ثانویه برای گیاه فراهم کرده و سبب کاهش اثرات تنش خواهد شد (El-Saddony et al., 2021). در مطالعه‌ای دیگر نشان داده شد که در حضور نانوذرات، ضخامت ریشه کمی بیشتر شده و همین مسئله می‌تواند مانع از جذب فلز سنگین شده در نتیجه آسیب کمتری به غشا وارد آید (Siddiqui et al., 2014).

از این طریق گیاه توانسته اثر منفی تنش سرب بر گیاه را تعدیل نماید. گزارش شده است که نانوذرات می‌توانند با افزایش دسترسی پیش‌سازهای آنتوسیانین مانند فنیل آلانین و مالونیل کوآ به آنزیم‌های کلیدی در مسیر بیوسنتز آنتوسیانین، تولید آن را تحریک کنند (Shavalibor *et al.*, 2019). به‌عبارتی، این افزایش تولید آنتوسیانین در اثر کربارد نانوذرات می‌تواند به دلیل افزایش سطح در دسترس آنتوسیانین برای سنتز و همچنین بهبود پایداری و دسترسی به پیش‌سازهای آن باشد.

**محتوی کارتنوئید:** این شاخص تحت تاثیر هیچکدام از اثرات ساده و متقابل تیمارهای مورد آزمایش قرار نرفت (جدول ۱).

فنول، فلاونوئید و آنتوسیانین به‌عنوان متابولیت‌های ثانویه و آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی (امید بیگی، ۱۳۸۴) در مطالعه حاضر، در شرایط تنش سرب نسبت به عدم تنش افزایش یافتند (جدول ۱). مهدی نژاد و همکاران (۲۰۱۹) بیان داشتند که گیاهان در مواجهه با تنش و کاهش رشد، کربن اضافه را برای ایجاد متابولیت‌های ثانویه مورد استفاده قرار می‌دهند در نتیجه تولید مواد فیتوشیمیایی مانند فنول و فلاونوئید افزایش می‌یابد. بنابراین به نظر می‌رسد گیاه همیشه بهار نیز از این استراتژی استفاده کرده است. همچنین مصرف هر دو نانوذرات Bw-IONPs و Ch-IONPs در مطالعه حاضر هم در شرایط تنش و هم در شرایط عدم تنش تولید این متابولیت‌ها را افزایش داد (Mahdi Nezhad *et al.*, 2019). مصرف Bw-IONPs نسبت به مصرف Ch-IONPs سبب افزایش بیشتر فنول، فلاونوئید و آنتوسیانین-ها در گیاه همیشه بهار در شرایط تنش و عدم تنش شد. همچنین این افزایش در شرایط عدم تنش بیشتر بود. گارسیا اواندو و همکاران (۲۰۲۲) به نقش نانوذرات سنتز شده به روش سبز در بیان برخی ژن‌ها در گیاه اشاره کردند. ایشان بیان داشتند که ممکن است توانایی بیشتر نانوذرات سنتز شده به روش سبز در ورود به سلول‌ها سبب نقش موثرتر آنها در بیان ژن‌های مقاومت به تنش در گیاهان شود (García-Ovando *et al.*, 2022).

**محتوی پرولین:** اثرات ساده و متقابل تنش سرب و ترکیبات آهن، میزان این شاخص را در سطح احتمال یک درصد تحت تاثیر قرار دادند (جدول ۱). تنش سرب محتوی پرولین را در کلیه تیمارهای کودی به‌طور قابل توجهی

بر میلی‌لیتر) در تیمار Bw-IONPs مشاهده شد و کاربرد اشکال Ch-IONPs و سولفات آهن به ترتیب باعث کاهش ۲۰ و ۲۳ درصدی این شاخص نسبت به فرم Bw-IONPs شد.

نانوذرات آهن در سطح مولکولی با سلول‌های زنده برهمکنش می‌دهند و سبب بهبود جذب مواد غذایی برای گیاه می‌شوند. با توجه به اینکه نانوذرات سبزاکسید آهن کوچکتر از مولکول‌های معمولی اکسید آهن همچنین نانوذرات شیمیایی آهن هستند، کمپلکس‌های بیشتری ایجاد می‌کنند و سطح آهن بالاتری را برای گیاه فراهم می‌کنند که سبب افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه از جمله فنول، فلاونوئید و کارتنوئیدها می‌شوند (Rizwan *et al.*, 2021). ترکیبات مذکور به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی در کاهش رادیکال‌های آزاد حاصل از فلزات سنگین بر گیاهان نقش قابل توجهی دارند (El-Saddony *et al.*, 2021).

**محتوی آنتوسیانین:** تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که محتوی آنتوسیانین در سطح احتمال یک درصد تحت تاثیر تنش سرب، ترکیبات آهن و برهمکنش آنها قرار گرفت (جدول ۱). به‌طور کلی، در تمامی ترکیبات کودی، تنش سرب منجر به افزایش قابل توجه محتوی آنتوسیانین شد. افزایش محتوی آنتوسیانین در پاسخ به تنش سرب می‌تواند به دلیل نقش حفاظتی این ترکیبات در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از سرب باشد (Ranjbar *et al.*, 2020). تایید شده است که آنتوسیانین در گیاه به‌عنوان آنتی‌اکسیدان عمل کرده و با رادیکال‌های آزاد تولید شده توسط سرب مقابله می‌کنند و از آسیب به سلول‌های گیاهی جلوگیری می‌کنند (Gerami *et al.*, 2021). در تیمار مصرف سولفات آهن، تنش سرب این شاخص را حدود ۴۶ درصد افزایش داد (جدول ۱). در شرایط عدم تنش سرب، مصرف ترکیبات Ch-IONPs و Bw-IONPs باعث کاهش محتوی آنتوسیانین نسبت به مصرف سولفات آهن شد که البته تنها Bw-IONPs اختلاف معنی‌داری با شاهد دارا بود. در زمان وجود تنش سرب نیز، مصرف هر دو نانوذرات Bw-IONPs و Ch-IONPs به‌طور معنی‌داری میزان آنتوسیانین را نسبت به شاهد افزایش دادند. میزان افزایش این شاخص تحت تاثیر ترکیب Bw-IONPs (۷۱ درصد) بیشتر از Ch-IONPs (۲۸ درصد) بود. به‌نظر می‌رسد، مصرف نانوکودهای مورد بررسی در شرایط تنش سرب باعث تهییج تولید آنتوسیانین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان غیرآنزیمی شده است. احتمالاً

اسید آمینه‌های لازم برای تولید پروتئین‌ها اثر می‌گذارند و یا ممکن است تجزیه پروتئین را افزایش داده و عملکرد سلول را مختل کنند. با این حال گیاهان سیستم‌های نظارتی سلولی متنوع و گسترده‌ای دارند که به آنها اجازه می‌دهد به‌طور مؤثری فلزات سنگین را سم‌زدایی کنند. همچنین گیاهان به آلودگی‌های محیطی مانند فلزات سنگین با فعال‌سازی بیان ژن‌هایی که پروتئین‌های مرتبط با پاسخ به تنش واکنش نشان می‌دهند (Hasan et al., 2017).

در مطالعه حاضر با توجه به کاهش پروتئین در اثر تنش سرب در گیاه همیشه بهار که تنها ۲۰ درصد گزارش شده است، به نظر می‌رسد گیاه مذکور از سیستم‌های خاصی برای جلوگیری از اثر سمیت فلز سنگین بر پروتئین‌ها استفاده کرده است. احتمالاً تحریک آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند فنول، فلاونوئید و آنتوسیانین توانسته است اثر استرس اکسیداتیو ناشی از فلز سنگین سرب را کاهش دهد. همچنین کاربرد هر دو نانوذرات IONPs به‌ویژه نانوذرات Bw-IONPs تاثیر تنش بر پروتئین را به‌طور قابل توجهی کاهش داد. در مطالعه‌ای که اثنی عشری و انتشاری (۲۰۱۸) بر تاثیر فلز سنگین آلومینیوم بر بادرنجبویه صورت گرفت، بیان داشتند که نانوذرات IONPs می‌تواند تاثیر فلز آلومینیوم را کاهش دهد ایشان دلیل این تاثیر نانوذره را به قطر، سرعت جذب، جایگزینی، تجمع و سطح مخصوص بیشتر نانوذرات IONPs، نسبت به فلزات نسبت دادند. احتمالاً جایگزینی نانوذرات IONPs به جای فلز سرب در ساختار حیاتی سلول، دلیل کاهش اثر فلز سرب در شرایط موجود می‌باشد (Asnaashari & Enteshari, 2018). تحقیقات اخیر حاکی از این است که نانوذرات IONPs می‌توانند با کاهش سطح آسیب‌های ناشی از تجمع سرب در ریشه و سایر اندام‌های گیاه، به جلوگیری از اثرات سمی سرب کمک کنند (Jamali-Behnam et al., 2018). این ویژگی‌ها باعث می‌شود که استفاده از نانوذرات IONPs به-عنوان یک راهکار سازگار با محیط زیست برای مدیریت خاک‌های آلوده به فلزات سنگین و افزایش بهره‌وری گیاهان در مناطق آلوده به فلزات سنگین، بسیار حائز اهمیت باشد (Mounier et al., 2023; Sharma et al., 2023).

نسبت به شرایط عدم تنش افزایش داد (جدول ۱). به‌عنوان مثال، در تیمار مصرف سولفات آهن، تنش سرب منجر به افزایش بیش از ۳/۵ برابری محتوی پروتئین نسبت به عدم تنش شد. در شرایط عدم تنش سرب، کاربرد Ch-IONPs (۶/۲۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) و Bw-IONPs (۷/۱۳ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) اختلاف معنی‌داری از نظر محتوی پروتئین نداشتند. ولی، به‌طور معنی‌داری میزان این شاخص در این دو تیمار کمتر از تیمار سولفات آهن (۱۰/۱۲ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) بود. در شرایط بدون تنش سرب، بیشترین محتوی پروتئین (۳۶/۱۳ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در تیمار مصرف سولفات آهن مشاهده شد و کاربرد ترکیبات Ch-IONPs و Bw-IONPs به ترتیب منجر به کاهش حدود ۳۲ و ۳۸ درصد این شاخص شدند.

**محتوی پروتئین:** تنش سرب و ترکیبات آهن در سطح احتمال یک درصد و برهمکنش تنش سرب و ترکیبات آهن در سطح احتمال پنج درصد تاثیر معنی‌داری بر میزان پروتئین برگ داشتند (جدول ۱). هم در شرایط تنش و هم عدم تنش، کمترین محتوی پروتئین به‌طور معنی‌داری در تیمار کاربرد سولفات آهن حاصل شد (جدول ۱). در تیمارهای مصرف سولفات آهن و Ch-IONPs، میزان پروتئین در شرایط بدون تنش به‌طور قابل توجهی بیشتر از شرایط تنش بود ولی در تیمار کاربرد Bw-IONPs، محتوی پروتئین در شرایط تنش (۴۹/۱۷ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) بدون اختلاف معنی‌دار بیشتر از عدم تنش (۴۸/۱۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) بود. در شرایط عدم تنش اختلاف معنی‌داری بین ترکیبات Ch-IONPs (۴۸/۲۰) و Bw-IONPs (۴۸/۱۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) وجود نداشت. ولی در تیمارهای تحت تنش سرب، میزان پروتئین در بوته-های تحت تیمار با Ch-IONPs (۳۹/۸۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) به‌طور معنی‌داری کمتر از تیمار با Bw-IONPs (۴۸/۱۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) بودند.

نتایج مطالعه حاضر حاکی از آن بود که تنش سرب در شرایط عدم مصرف هر دو نانوذرات IONPs، سبب کاهش ۲۰ درصدی در پروتئین، نسبت به شرایط عدم تنش می-شود. حسن و همکاران (۲۰۱۷) بیان داشتند، یون‌های فلزات سمی بر هموستاز پروتئینی سلول، تا شدن و تجمع

### نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش نانوذرات نانوذرات IONPs از طریق یک فرآیند شیمیایی ساده و دوست‌دار محیط زیست تولید شدند. نانوذرات IONPs تولید شده به‌طور کامل با انواع روش‌ها و ابزارهای تخصصی مورد بررسی قرار گرفتند و تولید نانوذرات Bw-IONPs کریستالی، کروی شکل و بسیار پایدار  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  پوشیده شده با گروه‌های عاملی ترکیبات زیست فعال نشان داده شد. شکل نانوذره عنصر آهن و مخصوصا Bw-IONPs در شرایط تنش سرب توانست سبب کاهش اثرات سمی سرب بر روی گیاه همیشه بهار شود. Bw-IONPs توانست با اختلاف معنی‌داری از بقیه اشکال آهن مورد بررسی در این مطالعه، سبب افزایش متابولیت‌های ثانویه شامل، فنول، فلاونوئید و آنتوسیانین شود.

احتمالا قدرت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فوق سبب ایجاد مقاومت در گیاه همیشه بهار و افزایش وزن خشک، کاهش MDA و کاهش تخریب پروتئین‌ها شود. بنابراین با توجه به اینکه ماده سنتز شده فوق، یک ترکیب دوست‌دار طبیعت است، استفاده از آن در ایجاد مقاومت به تنش سرب به گیاه همیشه بهار قابل توصیه است. با این حال تعیین مکانیسم‌های مقاومت، نیازمند مطالعات و بررسی‌های بیشتر خواهد بود.

### سپاسگزاری

این تحقیق توسط معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه شهید باهنر کرمان حمایت مالی شده است که بدین وسیله تشکر می‌گردد.

## منابع

- Abedini, S., Pourseyedi, S., Zolala, J., Mohammadi, H., & Abdolshahi, R. (2024). Green synthesis of Superparamagnetic Iron oxide and silver nanoparticles in satureja hortensis leave extract: Evaluation of Antifungal Effects on Botryosphaeriaceae Species. *Current Microbiology*, 81(6), 149. <https://doi.org/10.1007/s00284-024-03647-3>
- Adabavazeh, F., Nadernejad, N., Pourseyedi, S., Razavizadeh, R., & Mozafari, H. (2022). Synthesis of magnetic nanoparticles and their effects on growth and physiological parameters of Calotropis procera seedlings. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(39), 59027-59042. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-19660-7>
- Adabavazeh, F., Nadernejad, N., & Pourseyedi, Sh., (2001). *Study of the effects of synthesized iron nanoparticle and salicylic acid on change of physiological characteristics and essential oil contents of Calotropis procera hairy roots and seedlings*. Faculty of Science, Department of Biology, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
- Adabavazeh, F., Pourseyedi, S., Nadernejad, N., & Razavizadeh, R. (2023). Hairy root induction in Calotropis procera and optimization of its phytochemical characteristics by elicitors. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 155(2), 567-580. <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02481-y>
- Cui, J., Li, Y., Jin, Q., & Li, F. (2020). Silica nanoparticles inhibit arsenic uptake into rice suspension cells via improving pectin synthesis and the mechanical force of the cell wall. *Environmental Science: Nano*, 7, 162–171. <https://doi.org/10.1039/c9en01035a>
- de França Bettencourt, G. M., Degenhardt, J., Torres, L. A. Z., de Andrade Tanobe, V. O., & Soccol, C. R. (2020). Green biosynthesis of single and bimetallic nanoparticles of iron and manganese using bacterial auxin complex to act as plant bio-fertilizer. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 30, 101822. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101822>
- Dimkpa, C. O., White, J. C., Elmer, W. H., & Gardea-Torresdey, J. (2017). Nanoparticle and ionic Zn promote nutrient loading of sorghum grain under low NPK fertilization. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(39), 8552-8559. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02961>
- Esnaashari, E., & enteshari, S. (2018). Effects of iron chloride, iron chelate and nano-iron on enzymatic and non-enzymatic antioxidant mechanisms in Melissa officinalis Under Aluminum treatment. *Plant Process and Function*, 7 (23), 193-204. (In Persian) <https://doi.org/10.1026/ppf.jafc.7b02961>
- Fryzova, R., Pohanka, M., Martinkova, P., Cihlarova, H., Brtnicky, M., Hladky, J., & Kynicky, J. (2018). Oxidative stress and heavy metals in plants. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 245, 129-156. [https://doi.org/10.1007/398\\_2017\\_7](https://doi.org/10.1007/398_2017_7)
- García-Ovando, A. E., Piña, J. E. R., Naranjo, E. U. E., Chávez, J. A. C., & Esquivel, K. (2022). Biosynthesized nanoparticles and implications by their use in crops: Effects over physiology, action mechanisms, plant stress responses and toxicity. *Plant Stress*, 6, 100109. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2022.100109>
- Gerami, M., Majidian, P., Ghorbanpour, A., & Barati, N. (2021). Response of Aloysia citriodora L. to treatments of titanium dioxide nanoparticle and salt stress. *Environmental Stresses in Crop Sciences*, 14(2), 557-567. <https://doi.org/10.22077/escs.2020.2935.1755>
- Golkari, S., Pourseyedi, S., Kazemipour, A., & Mansouri, M. (2023). The effect of magnetic iron oxide nanoparticles and ferric chloride on the expression of some rosmarinic acid biosynthetic genes in Melissa officinalis L. *Agriculture Biotechnology Journal*, 15(1). fa235-fa254. <https://doi.org/10.22103/jab.2023.20035.1420>
- Gülser, F., & Arzu, Ç. I. G. (2020). Tolerance of hyacinth (Hyacinthus orientalis L. cv “Blue Star”) to lead contaminated media. *ISPEC Journal of Agricultural Sciences*, 4(1), 97-104. <https://doi.org/10.46291/ISPECJASvol4iss1pp97-104>
- Haghighi, M., & Kafi, M. (2014). The effect of cadmium toxicity on changes of proline and antioxidant in lettuce. *Journal Of Horticultural Science*, 27(4), 359-366. (In Persian) <https://doi.org/10.22067/jhorts4.v0i0.30529>
- Hasan, M. K., Cheng, Y., Kanwar, M. K., Chu, X. Y., Ahammed, G. J., & Qi, Z. Y. (2017). Responses of plant proteins to heavy metal stress—a review. *Frontiers in plant science*, 8, 1492. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01492>
- Irshad, M. A., Nawaz, R., ur Rehman, M. Z., Wijaya, L., Shakoar, M. B., Ahmad, S., Inaam, A., Razzaq, A., Rizwan, M., & Ali, S. (2021). Effect of green and chemically synthesized titanium dioxide nanoparticles on cadmium accumulation in wheat grains and potential dietary health risk: A field investigation. *Journal of Hazardous Materials*, 415, 1- 9. <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02481-y>
- Jalili Marandi, R. (2009). *Physiology of environmental stresses and resistance mechanisms in horticultural plants*. West Azarbayejan, Iran. Urmia University Jihad of Press. (In persian)

- Jamali-Behnam, F., Najafpoor, A. A., Davoudi, M., Rohani-Bastami, T., Alidadi, H., Esmaily, H., & Dolatabadi, M. (2018). Adsorptive removal of arsenic from aqueous solutions using magnetite nanoparticles and silica-coated magnetite nanoparticles. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 37(3), 951-960. <https://doi.org/10.1002/ep.12751>
- Khan, Z. U. H., Latif, S., Abdulaziz, F., Shah, N. S., Imran, M., Muhammad, N., ... & Khan, H. U. (2022). Photocatalytic response in water pollutants with addition of biomedical and anti-leishmanial study of iron oxide nanoparticles. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 234, 112544. <https://doi.org/10.1007/s40010-017-0391-4>
- Liu, J., Zhou, Q., & Wang, S. (2010). Evaluation of chemical enhancement on phytoremediation effect of Cd-contaminated soils with *Calendula officinalis* L. *International journal of phytoremediation*, 12(5), 503-515. <https://doi.org/10.1080/15226510903353112>
- Mahanty, S., Chatterjee, S., Ghosh, S., Tudu, P., Gaine, T., Bakshi, M., Das, S., Das, P., Bhattacharyya, S., Bandyopadhyay, S., & Chaudhuri, P. (2020). Synergistic approach towards the sustainable management of heavy metals in wastewater using mycosynthesized iron oxide nanoparticles: biofabrication, adsorptive dynamics and chemometric modeling study. *Journal of Water Process Engineering*, 37, 101426. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101426>
- Mahdi Nezhad, N., Mousavi, H., Fakheri, B., & Heidari, F. (2019). The assessment of the effects of the nanoparticles on some physiological traits changes, photosynthetic pigments and the prthenolide of chamomile plant (*Tanacetum parthenium*) under Water dificit stress. *Plant Process and Function*, 8 (29), 219-227. (In Persian) <https://doi.org/10.1026/ppf.jafc.7b02966>
- Mazaheri Tirani, M., Madadkar Haghjou, M., & Ismaili, A. 2019. Hydroponic grown tobacco plants respond to zinc oxide nanoparticles and bulk exposures by morphological, physiological and anatomical adjustments. *Functional Plant Biology*. <https://doi.org/10.1071/FP18076>
- Mohapatra, J., Mitra, A., Tyagi, H., Bahadur, D., & Aslam, M. (2015). Iron oxide nanorods as high-performance magnetic resonance imaging contrast agents. *Nanoscale*, 7(20), 9174-9184. <https://doi.org/10.1039/C5NR00055F>
- Mounier, L., Pédrot, M., Bouhnik-Le-Coz, M., & Cabello-Hurtado, F. (2023). Impact of iron oxide nanoparticles on a lead-polluted water-soil-plant system under alternating periods of water stress. *Environmental Science: Advances*, 2(5), 767-779. <https://doi.org/10.1039/D2VA00283C>
- Ndou, N., Rakgotho, T., Nkuna, M., Doumbia, I. Z., Mulaudzi, T., & Ajayi, R. F. (2023). Green synthesis of iron oxide (hematite) nanoparticles and their influence on Sorghum bicolor growth under drought stress. *Plants*, 12(7), 1425. <https://doi.org/10.3390/plants12071425>
- Pourghasemia, N., & Moradi, R. (2018). Potential of using beeswax waste as the substrate for borage (*Borago officinalis*) planting in different irrigation regimes. *Journal of Plant Process and Function*, 7(23), 163-178. (In Persian) <https://doi.org/10.1026/ppf.jafc.7b02966>
- Pourghasemian, N., Moradi, R., Naghizadeh, M., & Landberg, T. (2020). Mitigating drought stress in sesame by foliar application of salicylic acid, beeswax waste and licorice extract. *Agricultural Water Management*, 231, 105997. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2019.105997>
- Ranjbar, M., Esmaily, S., & Moshtaghi, A. A. (2020). Lead and nickel effect on some physiological and biochemical characteristics of (*Anethum graveolens* L.). *Journal of Plant Biological Sciences*, 12(2), 1-22. doi: 10.22108/ijpb.2020.117860.1158
- Rawat, S., & Singh, J. (2021). Green synthesis of iron nanoparticles using Plumeria and Jatropha: characterization and investigation of their adsorption, regeneration and catalytic degradation efficiencies. *BioNanoScience*, 11(4), 1142-1153. <https://doi.org/10.1007/s40010-017-0391-4>
- Rizwan, M., Ali, S., ur Rehman, M. Z., Riaz, M., Adrees, M., Hussain, A., ... & Rinklebe, J. (2021). Effects of nanoparticles on trace element uptake and toxicity in plants: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 221, 112437. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.09.003>
- Saadony, M. T., ALmoshadak, A. S., Shafi, M. E., Albaqami, N. M., Saad, A. M., El-Tahan, A. M., et al. (2021). Vital roles of sustainable nano-fertilizers in improving plant quality and quantity-an updated review Saudi *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28, 7349–7359. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.110038>
- Samani, M., Ahlawat, Y. K., Golchin, A., Alikhani, H. A., Baybordi, A., Mishra, S., & Şimşek, Ö. (2024). Nano silica's role in regulating heavy metal uptake in *Calendula officinalis*. *BMC Plant Biology*, 24(1), 598. <https://doi.org/10.1186/s12870-024-05311-1>
- Sebastian, A., Nangia, A., & Prasad, M. N. V. (2018). Green Synthesis of Iron Nanoparticles from Selected Plant Materials of Peninsular India. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section A: Physical Sciences*, 88, 195-203. <https://doi.org/10.1007/s40010-017-0391-4>
- Shahzad, R., Harlina, P. W., Khan, S. U., Koerniati, S., Hastilestari, B. R., Ningrum, R. A., Wahab, R., Djalovic, I., & Prasad, P. V. (2024). Iron oxide nanoparticles alleviate salt-alkaline stress and improve growth by modulating antioxidant defense system in cherry tomato. *Journal of Plant Interactions*, 19(1), 2375508. <https://doi.org/10.1080/17429145.2024.2375508>

- Sharma, B., Tiwari, S., Kumawat, K. C., & Cardinale, M. (2023). Nano-biofertilizers as bio-emerging strategies for sustainable agriculture development: Potentiality and their limitations. *Science of The Total Environment*, 860, 160476. <https://doi.org/10.1007/s40726-023-00290-7>
- Sheikhabahaei, N., Rezanejad, F., & Arvin, S. M. J. (2020). Mozafati date as a potential treasure of calcium and antioxidant compounds: assessment of these phytochemicals during development. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(3), 1273-1285. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00375-7>
- Siddiqui, M. H., Al Whaibi, M. H., Faisal, M., & Al Sahli, A. A. (2014). Nano silicon dioxide mitigates the adverse effects of salt stress on *Cucurbita pepo* L. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 33, 2429–2437. <https://doi.org/10.1002/etc.2697>
- Tombuloglu, H., Slimani, Y., Akhtar, S., Alsaheed, M., Tombuloglu, G., Almessiere, M. A., ... & Ercan, I. (2022). The size of iron oxide nanoparticles determines their translocation and effects on iron and mineral nutrition of pumpkin (*Cucurbita maxima* L.). *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 564, 170058. <https://doi.org/10.1007/s40010-017-0391-4>
- Usman, M., Farooq, M., Wakeel, A., Nawaz, A., Cheema, S. A., & Rehman, H. (2020). Nanotechnology in agriculture: current status, challenges and future opportunities. *Science of the Total Environment*. 721:137778. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137778>
- Venugopal, R., Dhanyaprabha, K. C., Thomas, H., & Sini, R. (2020). Optical characterisation of cadmium doped Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> ferrofluids by co-precipitation method. *Materials Today: Proceedings*, 25, A1-A5. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.03.142>
- Win, T. T., Khan, S., Bo, B., Zada, S., & Fu, P. (2021). Green synthesis and characterization of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles using Chlorella-K01 extract for potential enhancement of plant growth stimulating and antifungal activity. *Scientific Reports*, 11(1), 21996. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-01538-2>
- Winiarczyk, K., Gac, W., Góral-Kowalczyk, M., & Surowiec, Z. (2021). Magnetic properties of iron oxide nanoparticles with a DMSA-modified surface. *Hyperfine Interactions*, 242(48), 1-13. <https://doi.org/10.1007/s10751-021-01768-w>
- Yang, X., Alidoust, D., & Wang, C. (2020). Effects of iron oxide nanoparticles on the mineral composition and growth of soybean (*Glycine max* L.) plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 42(8), 1-11. <https://doi.org/10.1007/s40010-017-0391-4>
- Zhang, J., Lin, S., Han, M., Su, Q., Xia, L., & Hui, Z. (2020). Adsorption properties of magnetic magnetite nanoparticle for coexistent Cr (VI) and Cu (II) in mixed solution. *Water*, 12(2), 446. <https://doi.org/10.3390/w12020446>

## Investigating the potential of green synthesis of magnetic iron nanoparticles using beeswax waste and its impact on marigold under lead stress

Nasibeh Pourghasemian<sup>\*1, 2</sup>, Sara Abedini<sup>3</sup>, Rooholla Moradi<sup>4</sup>

1. Associate Professor, Department of Plant Production, Agricultural Faculty of Bardsir, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

2. Research group cultivation and processing of saffron and damask rose, Shahid Bahonar University, Kerman, Iran

3. Ph.D. graduate, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

4. Associate Professor, Department of Plant Productions, University of Torbat Heydarieh, Torbat Heydarieh, Iran

Received: 11-05-2025

Accepted: 23-07-2025

### Abstract

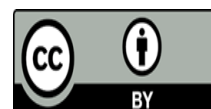
The present study was designed and implemented to investigate the possibility of green synthesis of magnetic iron oxide nanoparticles (IONPs) in the presence of aqueous and ethanolic extracts of beeswax waste (Beeswax waste, Bw) as an agricultural waste and to evaluate the effect of IONPs nanoparticles synthesized by Bw (Bw-IONPs) compared to chemical nanoparticles (Ch-IONPs) on marigold plant under lead stress conditions. In the following study, the experiment was conducted as a factorial experiment in a completely randomized design in a hydroponic environment. The experimental treatments included two levels of lead (0 and 300 mg/L) and three different forms of iron (ferrous sulfate as control, Bw-IONPs, Ch-IONPs) in three replications. The results showed that the dry weight of the shoot, root, chlorophyll a, total chlorophyll and protein decreased by about 46, 41, 44, 33 and 15 percent under lead stress, respectively, and increased by about 20, 6, 39, 27 and 14 percent with the use of nanoparticles, especially Bw-IONPs nanoparticles, respectively. However, phenol, flavonoid and anthocyanin increased under lead stress conditions and showed a further increase with the use of iron in the form of nanoparticles, especially Bw-IONPs nanoparticles. The above compounds appeared to act as antioxidants for the plant. The superiority of Bw-IONPs nanoparticles over other forms of iron under stress conditions may indicate the possibility of using nanoparticles synthesized by green methods in the development of sustainable agricultural methods and protection of natural resources and provide new solutions to deal with problems caused by soil pollution and environmental stresses

**Keywords:** Anthocyanins, Flavonoid, Heavy metal, Hydroponics, Nanoparticles

**Citation:** Pourghasemian, N., Abedini, S., & Moradi, R. (2025). Investigating the potential of green synthesis of magnetic iron nanoparticles using beeswax waste and its impact on marigold under lead stress. *Plant Production and Genetics*, 6(1), 35-52. <https://doi.org/10.22034/plant.2025.143673.1160>

#### Copyrights:

Copyrights rights for this article is retained by the author (s), with publication rights granted to Plant Production and Genetics. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.



\*Corresponding Author Email: [n.pourghasemian@uk.ac.ir](mailto:n.pourghasemian@uk.ac.ir)