

اثر نانوذره TiO_2 بر شاخص‌های سیتوژنتیکی و فیزیولوژیکی نخود (*Cicer arietinum* L.)

Effect of TiO_2 nanoparticle on cytogenetic and physiological indices of chickpea (*Cicer arietinum* L.)

یاسین خالدیان^۱، رضا معالی امیری^{۱*}، رحمت محمدی^۲

۱- به‌ترتیب دانشجوی دکتری، استاد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران

۲- استادیار، موسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مراغه، ایران

Khaledian Y¹, Maali-Amiri R^{*1}, Mohammadi R²

1. PhD Student, Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

2. Assistant Professor, Dryland Agricultural Research Institute, Ministry of Jihad-e-Agriculture Research and Education Organization, Maragheh, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: rmamiri@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۸/۰۱/۱۹ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۲/۰۳)

چکیده

در این آزمایش شاخص‌های سیتوژنتیکی و پاسخ‌های فیزیولوژیکی نخود زراعی ژنوتیپ Sel96th11439 تحت اثر غلظت‌های صفر، ۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی گرم نانوذره در لیتر مطالعه شد. در گیاهان شاهد هیچ گونه اختلالات کروموزومی مشاهده نشد و میزان شاخص میتوزی ۲۵ درصد بود. با افزایش غلظت نانوذره، میزان شاخص میتوزی کاهش نشان داد به غیر از غلظت ۲۵ میلی گرم در لیتر که بیشترین میزان شاخص میتوزی را داشت. پایین‌ترین میزان شاخص میتوزی (۱۴ درصد) در غلظت ۲۰۰ میلی گرم در لیتر به دست آمد که در مقایسه با شاهد معنی‌دار بود. اثر نانوذرات TiO_2 بر میزان MDA ، ELI ، H_2O_2 ، شاخص میتوز، شاخص انحرافات کروموزومی در سطح یک درصد و شاخص آنافاز در سطح پنج درصد معنی‌دار بود در حالی که بر روی شاخص‌های متافاز و تلوفاز معنی‌دار نبود. در نمونه‌های شاهد و هم‌چنین تا غلظت ۵۰ میلی گرم در لیتر هیچ گونه متافاز، آنافاز و تلوفاز بهم ریخته مشاهده نشد در حالی که در غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر تلوفاز بهم ریخته و در غلظت ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی گرم در لیتر آنافاز، متافاز و تلوفاز بهم ریخته مشاهده شد. تیمار نانوذره در غلظت‌های پایین (۵ میلی گرم در لیتر) تغییر معنی‌داری در شاخص‌های سیتوژنتیکی و فیزیولوژیکی ایجاد نکرد. غلظت‌های بالاتر از ۱۰۰ میلی گرم در لیتر نانوذره خسارت جدی فیزیولوژیکی و سیتوژنتیکی در گیاه نخود ایجاد کرد به طوری که باعث کاهش شاخص میتوز شد. به نظر می‌رسد غلظت‌های بالای نانوذره TiO_2 به علت تولید رادیکال‌های آزاد (ROS) باعث صدمه به اندامک‌های سلولی و DNA شده و سبب ایجاد اختلالات کروموزومی می‌شود.

واژه‌های کلیدی

شاخص سیتوژنتیکی

نانوذره TiO_2

نخود

ELI

MDA

مقدمه

مابین آخرین نوآوری‌ها، نانوتکنولوژی جایگاه مهمی در کشاورزی و تولیدات غذایی به خود اختصاص داده است. گسترش نانو دستگاه‌ها و نانو مواد می‌تواند کاربردهای جدیدی در بیوتکنولوژی و کشاورزی ایجاد کنند (Scrini et al. 2007). یکی از زمینه‌های تحقیقاتی نانوتکنولوژی، کاربرد نانوذرات^۱ (NPs) در کشاورزی است. نانوذرات به دلیل خصوصیات فیزیکوشیمیایی نسبت به مواد اولیه بزرگ‌تر، خواص متفاوتی از خود نشان می‌دهند (Nel et al. 2006). علت این موضوع را می‌توان به اندازه آن‌ها نسبت داد. با کوچک شدن اندازه ذرات، تعداد اتم‌های سطحی زیاد می‌شود؛ در یک ذره با قطر حدود ۴ نانومتر حدود ۳۰ درصد اتم‌ها در سطح قرار می‌گیرند. واضح است انرژی اتم‌ها در سطح با انرژی آن‌ها در داخل مواد متفاوت است (Lin and Xing 2007). نانوذرات می‌توانند از مواد اولیه متنوعی تهیه شوند که عملکرد آن‌ها به ترکیبات شیمیایی، اندازه و شکل ذرات بستگی دارد (Nel et al. 2006). نانوذرات به دو گروه طبیعی یا سنتز شده دسته‌بندی شده (ASTM 2012) که نانوذرات سنتز شده یا مهندسی شده^۲ (ENPs) بر پایه فلز یا کربن (CNTs^۳) هستند (Peralta-Videa et al. 2011). نانوذرات ساخته شده بر پایه کربن شامل فلورین^۴ و نانوتیوب (نانوتیوب‌های کربنی تک دیواره (SWCNT)^۵ و نانوتیوب‌های کربنی چند دیواره (MWCNT)^۶) هستند، نانوذرات فلزی به گروه‌های فلزات اکسیدهای فلز و نقاط کوانتومی (QDs)^۷ تقسیم‌بندی می‌شوند (PeraltaVidea et al. 2011). مابین نانوذرات مهندسی شده بر پایه فلز، اکسید روی (ZnO)، دی‌اکسید تیتانیوم (TiO_2)، طلا (Au) و نقره (Ag) بیشترین کاربرد را در کشاورزی دارند (Servin and White 2016).

نانوذره TiO_2 اکسیدهای فلزی با خصوصیات و کاربردهای گسترده هستند. TiO_2 در طبیعت در سه فاز روتیل^۸، آناتاز^۹ و بروکیت^{۱۰} یافت می‌شود. فاز روتیل فراوان‌ترین فاز در طبیعت می‌باشد. فاز بروکیت در طبیعت نادر است و هیچ خاصیت فوتوکاتالیزوری از خود نشان نمی‌دهد. دو نوع ساختار بلوری روتیل و آناتاز معمولاً به عنوان فوتوکاتالیزور به کار می‌روند (Landmann et al. 2012). به علت تولید فراوان و رهاسازی نانومواد در طبیعت امروزه آلودگی محیط زیست از مخاطرات مهم در زمینه سلامت و تغذیه محسوب می‌شود. لذا یکی از جنبه‌های مهم تحقیقات نانوتکنولوژی در کشاورزی ارزیابی تاثیر نانومواد بر روی محیط، سلامت انسان و اکوسیستم می‌باشد. گزارش‌ها نشان داده که سالانه حدود ۳۰۰۰ تن نانوذرات TiO_2 تولید شده که بیش از ۵۰٪ آن در محصولات بهداشتی، آرایشی و بهداشتی و مراقبت شخصی استفاده می‌شود (Weir et al. 2012; Keller et al. 2013). علاوه بر این نانوذرات به طور مؤثر در آماده‌سازی فرمول‌های جدید حشره‌کش‌ها، آفت‌کش‌ها و دفع‌کننده‌های حشرات استفاده می‌شوند (Barik et al. 2008; Gajbhiye et al. 2009). نانوتیوب رس^{۱۱} به عنوان حامل حشره‌کش، انتشار گسترده آن و تماس بهتر حشره‌کش با گیاه را ایجاد کرده به طوری که میزان مصرف آفت‌کش را ۷۰ تا ۸۰ درصد کاهش می‌دهد، چنین دستاوردهایی هزینه بکارگیری حشره‌کش را کاهش داده و تاثیر آن بر روی محیط‌زیست نیز کمتر می‌کند (Murphy 2004). حامل‌های نانویی می‌توانند برای توزیع^{۱۲} مؤثر کودها، حشره‌کش‌ها، علف‌کش‌ها، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و غیره استفاده شوند (Prasad et al. 2014). نانو مواد (NMs)^{۱۳} در زمینه بیوتکنولوژی محصولات کشاورزی برای اصلاح محصولات زراعی استفاده شده است. NMs به عنوان حامل‌های انتقال ژن به گیاه استفاده شده است (Pérez-de-Luque and Rubiales 2009). نانوذرات طلا در زمینه شناسایی بیومولکول‌ها استفاده شده‌اند (Liu et al. 2012). تحقیقات نشان داده که پتانسیل گسترش

⁸ Rutile⁹ Anatase¹⁰ Brookite¹¹ Clay nanotube¹² Delivery¹³ Nanomaterials¹ Nanoparticles (NPs)² Engineered nanoparticles³ Carbon nanotubes⁴ Fullerene⁵ Single-walled-CNTs⁶ Multi-walled-CNTs⁷ Quantum dots

استفاده از این نانوذرات می‌تواند در بهبود ویژگی‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاهان نیز به‌کار گرفته شود (Wei et al. 2012; Berahmand et al. 2010). نانوذره SiO_2 باعث افزایش تحمل گیاهان به تنش‌های غیر زیستی شده است (Rico et al. 2013). با این وجود برخی مطالعات به اثرات منفی این نانوذرات در گیاهان اشاره کرده‌اند (Nair et al. 2010; Castiglione et al. 2011). اگرچه بیشتر تحقیقات صورت گرفته بر روی میکروارگانیزم‌ها، سلول‌های جانوری و انسانی انجام گرفته (Zhang et al. 2005; Feizi et al. 2012) اما گیاهان به‌دلیل ساکن بودن در محل به میزان زیادی در معرض نانوذرات قرار می‌گیرند. لذا بررسی اثرات سمی و خسارت‌های سلولی استفاده از نانوذرات در گیاهان می‌تواند شاخص مطلوبی در زمینه سلامت به‌کارگیری آن‌ها در سلول‌های زنده باشد. برخی گزارش‌ها نشان داده‌اند که به‌کارگیری نانوذرات موجب کاهش میزان رادیکال آزاد سلولی (ROS^1) می‌شود. این نانوذرات فعالیت‌های آنزیم‌های آنتی اکسیدانی را افزایش داده و بیان microRNAs تنظیم‌کننده خصوصیات مورفولوژیکی، فیزیولوژی و متابولیسم در گیاهان را تغییر می‌دهد (Siddiqi and Husen 2016). ROS از طریق پراکسیداسیون لیپید باعث خسارت به غشای سلولی شده و نشت الکترولیتی و اختلال متابولیسم سلولی را ایجاد می‌کند که در نهایت منجر به مرگ سلول می‌شود (Das and Roychoudhury 2014). بنابراین به‌نظر می‌رسد سلول‌های گیاهی از طریق آنتی اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی از اثرات مخرب ROS جلوگیری می‌کنند (Ozyigit et al. 2016). در ذرت تحت اثر نانوذره CeO_2 فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز، آسکوربات افزایش یافته به‌طوری که پراکسیداسیون لیپیدی و آسیب فیزیولوژیکی سلول کاهش یافت. با این وجود در غلظت‌های بالاتر از ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آسیب‌های سلولی در این گیاهان مشاهده شد (Rico et al. 2013). گزارش شده که در گیاهان نانوذرات اثراتی مانند آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی دارند. به‌طور مثال نانوذرات Fe_3O_4 و Co_3O_4 فعالیت‌هایی همانند کاتالاز داشته در حالی که نانوذرات CeO_2 ، Fe_3O_4 ، Co_3O_4 ، MnO_2 ، CuO و Au فعالیت پراکسیدازی نشان می‌دهند. با این وجود مکانیسم چنین

واکنش‌هایی شناسایی نشده اما به‌نظر می‌رسد این اثرات به علت ویژگی شیمیایی نانوذرات یا به‌علت برهم‌کنش آن‌ها با آنزیم‌ها باشد. ثابت شده نانوذرات SiO_2 سبب افزایش رشد جوانه‌زنی، رشد گیاهان، تغییر وزن خشک، الفا سنتز کلروفیل و برخی ویژگی‌های متابولیسم در موجودات فتوسنتز شده است (Suriyaprabha et al. 2012a, b; Siddiqui and Al-Wahaibi 2014). افزایش عملکرد در مطالعات صورت گرفته به‌علت کاهش شاخص‌های خسارت سلولی و افزایش سیستم دفاعی گیاه بوده است (Feizi et al. 2012; Singh et al. 2012). نانوذره TiO_2 باعث افزایش رشد، عملکرد، محتویات گلوتن و ساکارز طی تنش خشکی در گندم شده است (Jaberzadeh et al. 2013). همچنین در کتان طی تنش خشکی باعث افزایش محتویات کلروفیل و کارتنوئید، رشد و عملکرد گیاه شده و سبب کاهش محتوی H_2O_2 و MDA می‌شود. در ریحان این نانوذرات سبب کاهش اثرات تنش خشکی شده است (Kiapour et al. 2015). نانوذرات TiO_2 در گیاه نخود تحت تنش سرما باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، افزایش بیان ژن‌های Rubisco و پروتئین‌های متصل شونده به کلروفیل، کاهش H_2O_2 و MDA و میزان نشت الکترولیتی شده است (Mohammadi et al. 2013 and 2014; Hasanpour et al. 2015). نانوذرات TiO_2 در گیاه گوجه فرنگی طی تنش گرما از طریق تنظیم مصرف انرژی باعث افزایش کارایی فتوسنتز و کاهش دمای برگ از طریق افزایش دوره باز ماندن روزنه‌ها شده است. با این وجود برخی از نانوذرات اثرات منفی بر گیاهان، جلبک‌ها و میکروارگانیزم‌ها دارند (Navarro et al. 2016; Siddiqi and Husen 2008). جذب و تجمع نانومواد در گیاهان ممکن است طول ساقه را افزایش دهد در حالی‌که طول و تعداد ریشه‌ها را به‌علت سمیت آن‌ها بر خصوصیات سلولی کاهش دهند (Lin and Xing 2007; Atha et al. 2012). نشان داده شده که سمیت ENPs با توجه به نوع، غلظت، ژنوتیپ و گونه‌های گیاهی متفاوت است. در گیاهان ارزیابی سمیت به‌طور معمول طی مرحله جوانه‌زنی با استفاده از شاخص‌های خسارت سلولی مانند ELI ، MDA ، H_2O_2 ، سمیت سلولی^۲ و اثرات مخرب آن بر DNA و تقسیم میتوز (Khodakovskaya et al. 2011 and

² Cytotoxicity¹ Reactive oxygen species

میدان دید عدسی با میکروسکوپ نوری مورد بررسی و شمارش شد. در هر میدان دید، تعداد کل سلول‌ها، تعداد سلول‌های ایتترفازی، تعداد سلول‌ها در هر کدام از مراحل مختلف تقسیم میتوز و سلول‌های با انحراف کروموزومی از قبیل آنافاز به‌هم‌ریخته^۲، متافاز به‌هم‌ریخته^۳، تلوفاز به‌هم‌ریخته^۴، شاخص میتوزی^۵ (تعداد سلول‌های در حال تقسیم بر تعداد کل سلول‌ها)، شاخص متافازی^۶ (تعداد سلول‌های متافازی بر تعداد سلول‌های در حال تقسیم)، شاخص آنافازی^۷ (تعداد سلول‌های آنافازی بر تعداد سلول‌های در حال تقسیم) شاخص انحراف کروموزومی^۸ (تعداد سلول‌های دارای انحراف بر تعداد سلول‌های در حال تقسیم) محاسبه شد (Bahatta and Sakay 2008).

به‌منظور استخراج و سنجش فعالیت پراکسید هیدروژن 0.35 گرم نمونه تازه گیاهی با نیتروژن مایع در هاون چینی به پودر تبدیل شد. پودر تهیه شده به فالكون 15 میلی‌لیتری انتقال یافت و سپس 5 میلی‌لیتر محلول تری‌کلرواستیک اسید یک درصد به تیوب اضافه شد و تیوب‌ها تا یکنواخت شدن نمونه‌ها در حمام یخ قرار داده شد. تیوب حاوی نمونه یکنواخت شده به مدت 15 دقیقه و در دمای 4°C با سرعت $2000 \times g$ سانتریفوژ شد. سپس 0.5 میلی‌لیتر از مایع رویی به یک تیوب جدید حاوی یک میلی‌لیتر محلول یک مولار یدید پتاسیم و 0.5 میلی‌لیتر بافر فسفات 10 میلی‌مولار افزوده شد و پس از چندبار وارونه کردن تیوب در محیط تاریک برای یکنواخت نمودن محتوای آن، مقدار جذب هر نمونه در طول موج 390 nm اندازه‌گیری شد (Loreto and Velikova 2001).

در اندازه‌گیری میزان هدایت الکترولیتی از برگ‌های کاملاً سالم بخش میانی ساقه استفاده شد. هشتاد میلی‌گرم برگ به لوله آزمایش حاوی 10 میلی‌لیتر آب مقطر انتقال یافت. جهت جذب بهتر آب با استفاده از پمپ خلا هوای درون محیط خارج شده و لوله‌های آزمایش به مدت 30 دقیقه در دستگاه شیکر قرار گرفتند. میزان

اندازه‌گیری می‌شود. بنابراین گسترش کاربرد نانوذرات در کشاورزی و علوم گیاهی مستلزم بررسی اثرات سمی آن‌ها بر ویژگی‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی می‌باشد. در این تحقیق از روش تست شاخص‌های خسارت سلولی در ریشه و اثرات نانوذره TiO_2 بر روی ویژگی‌های شاخص‌های تقسیم سلولی ریشه استفاده شده است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از ژنوتیپ نخود زراعی Sel96th11439 تهیه شده از موسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور-مراغه، استفاده شد. جهت جوانه زنی بذور، 10 بذر نخود در هر پتری دیش بر روی کاغذ صافی استریل قرار داده شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً صادفی در سه تکرار انجام شد که تیمارهای آزمایشی شامل محلول‌های نانوذره TiO_2 با غلظت‌های صفر، 5 ، 25 ، 50 ، 100 ، 150 و 200 میلی‌گرم در لیتر بودند. در تیمار صفر از آب مقطر استفاده شد. هر پتری محتوی 11 میلی‌لیتر از محلول مورد نظر بود. پتری‌دیش‌ها حاوی بذور به مدت 40 ساعت در دمای اتاق قرار گرفته و پس از یک ساعت قرارگیری در یخچال 4 درجه سانتی‌گراد به ژرمیناتور با دمای 25 درجه سانتی‌گراد به مدت 7 ساعت منتقل شدند. سپس یک سانتی‌متر از انتهای ریشه‌ها برش داده شد و پس از شستشو با آب مقطر در محلول تثبیت‌کننده لویسکی^۱ در یخچال 4 درجه سانتی‌گراد به مدت 24 ساعت قرار داده شد. ریشه‌ها از محلول تثبیت‌کننده خارج و پس از شستشو با آب، به مدت دو ساعت در الکل 70 درصد و در یخچال 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جهت تهیه اسلاید، ریشه‌ها از الکل 70 درصد خارج و پس از شستشو با آب مقطر به مدت 11 دقیقه در NaOH یک نرمال در دمای 60 درجه سانتی‌گراد هیدرولیز شدند. در نهایت ریشه‌ها به مدت 15 دقیقه با آب مقطر شسته شده و به مدت نیم ساعت در رنگ همتوکسیلین در دمای اتاق قرار داده شدند (Zheng et al. 2016). دو میلی‌متر از نوک ریشه جدا و بر روی لام قرارداده شد. یک قطره اسید استیک 45 درصد به نمونه اضافه شده و با حذف قسمت کلاهک، ریشه له شد. از هر تیمار شش اسلاید تهیه شد و در هر اسلاید به‌طور تصادفی 10

¹ Levitsky

² Abnormal anaphase

³ Abnormal metaphase

⁴ Abnormal telophase

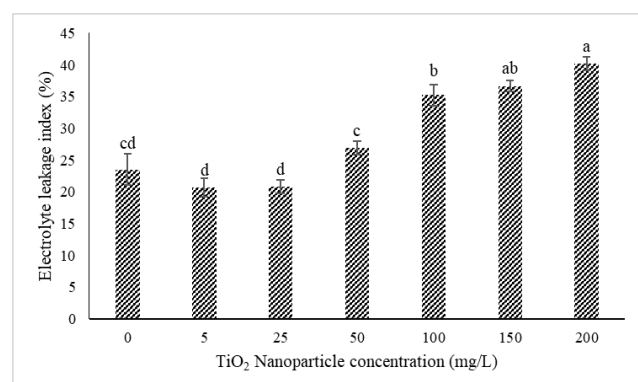
⁵ Mitotic index

⁶ Metaphase index

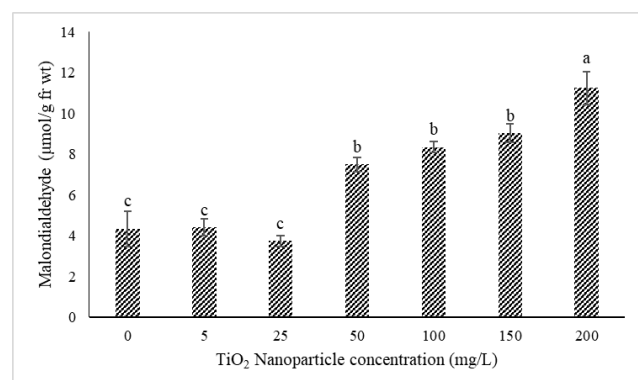
⁷ Anaphase index

⁸ Chromosomal distribution index

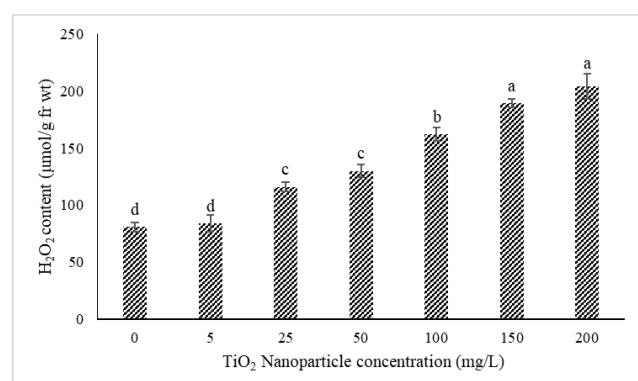
نبود. به نظر می‌رسد که غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر تولید تنش اکسیداتیو در ریشه نخود نمی‌کند.



شکل ۱- الگوی تغییر شاخص نشت الکترولیتی (%) تحت تیمارهای غلظت نانوذره TiO_2 در نوک ریشه نخود زراعی. حروف مختلف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن است.



شکل ۲- الگوی تغییر میزان مالون دی‌آلدئید تحت تیمارهای غلظت نانوذره TiO_2 در نوک ریشه نخود زراعی. حروف مختلف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن است.



شکل ۳- الگوی تغییر میزان H_2O_2 تحت تیمارهای غلظت نانوذره TiO_2 در نوک ریشه نخود زراعی. حروف مختلف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن است.

هدایت الکترولیتی نمونه‌ها (EC1) با استفاده از دستگاه EC متر (Inolab, آلمان) قرائت شد. در مرحله دوم میزان هدایت الکترولیتی (EC2) محتوی لوله آزمایش، پس از ۱۰ دقیقه قرارگیری در حمام آب جوش (۹۵ درجه سانتی‌گراد) و سپس ۳۰ دقیقه قرارگیری در دستگاه شیکر تعیین شد و در نهایت میزان شاخص خسارت براساس فرمول $I = \text{EC1}/\text{EC2} \times 100$ محاسبه شد (Popov et al. 2005).

جهت اندازه‌گیری پراکسیداسیون غشا سلولی ۰/۲ گرم از بافت تازه برگ‌های توزین و در هاون چینی با ۵ میلی‌لیتر اسید تری کلرواستیک (TCA) ۰/۱ درصد ساییده شد. عصاره حاصل با استفاده از دستگاه سانتریفوژ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. به یک میلی‌لیتر از محلول رویی حاصل از سانتریفوژ ۴/۵ میلی‌لیتر محلول TCA ۲۰٪ که دارای ۵ گرم تیوباربیتوریک اسید (TBA) در ۱۰۰ گرم بود، اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با $\times 4000g$ سانتریفوژ شد. شدت جذب این محلول با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد. ماده مورد نظر برای جذب در این طول موج کمپلکس قرمز (MDA-TBA) است. جذب بقیه رنگیزه‌های غیراختصاصی در ۶۰۰ نانومتر تعیین و از این مقدار کسر شد (Bates et al. 1973). پس از تجزیه داده‌ها به کمک نرم‌افزار SAS مقایسه میانگین بر اساس روش دانکن در سطح پنج درصد انجام شد.

نتایج و بحث

شاخص‌های ELI ، MDA و H_2O_2 به‌منظور برآورد اثر نانوذره TiO_2 بر غشای سلولی در مریستم نوک ریشه نخود اندازه‌گیری شد (شکل‌های ۱، ۲ و ۳). این شاخص‌ها قبلاً نیز در برآورد اثر نانوذره TiO_2 بر گیاهچه‌های نخود استفاده شده بود (Mohammadi et al. 2013 and 2014). در غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر کمترین میزان MDA و ELI مشاهده شد که نشان می‌دهد احتمالاً نانوذرات TiO_2 ، در ریشه با مکانیسم مشابه با برگ (Mohammadi et al. 2014)، میزان تنش اکسیداتیو را در این غلظت کاهش می‌دهد. در این غلظت هر چند میزان H_2O_2 در مقایسه با شاهد افزایش یافته اما این افزایش ناچیز بوده و معنی‌دار

فعال‌سازی برخی از مکانیسم‌های درونی سلولی مانند سیستم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاه می‌شود. همچنین داده‌های حاصل از میزان H_2O_2 ، نشان می‌دهد که پاسخ گیاه نخود به غلظت‌های مختلف نانوذره TiO_2 یک پاسخ اختصاصی است (Nair et al. 2010). پژوهش حاضر گزارشات گذشته در خصوص اینکه کاربرد غلظت‌های پایین نانوذرات TiO_2 ، تنش‌های اکسیداتیو را در گیاهان را در غلظت‌های پایین القا نمی‌کند تایید کرد (Mohammadi et al. 2013 and 2014) چنین مکانیسم‌هایی می‌توانند ساختار غشای پلاسمایی را در برابر صدمات ROS محافظت کند نتایجی که با کاهش میزان MDA و ELI در غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد. در ادامه برای بررسی این فرضیه که غلظت‌های پایین نانوذره TiO_2 اثر سمی بر نخود ندارد، اثر نانوذره TiO_2 بر رفتار کروموزوم‌ها و تقسیم میتوز در نوک ریشه مطالعه شد (جدول ۱ و شکل ۴). برای ارزیابی سمیت نانوذره، بررسی خصوصیات تقسیم میتوز طی مرحله جوانه‌زنی در نوک ریشه گیاهان بسیار متداول است (Kumari et al. 2009; Castiglione et al. 2011).

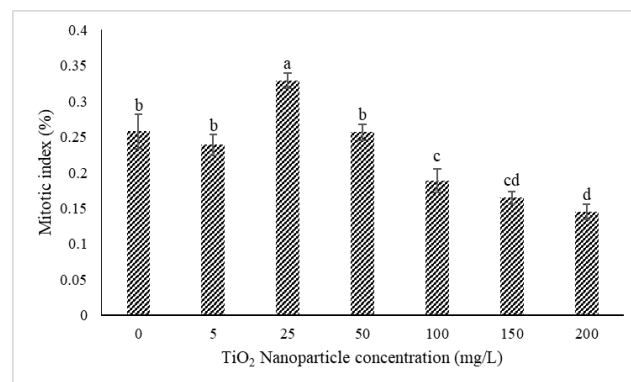
با این وجود در غلظت ۲۵ میلی‌گرم در لیتر، میزان H_2O_2 افزایش معنی‌دار در مقایسه با شاهد داشت. در حالی که شاخص‌های MDA و ELI در مقایسه با شاهد افزایش معنی‌داری نشان ندادند. نظر به اینکه شاخص‌های ELI و MDA اغلب متعاقب افزایش میزان ROSها نشان‌دهنده خسارت سلولی هستند لذا به‌نظر می‌رسد این افزایش H_2O_2 منجر به تنش اکسیداتیو نشده، بلکه احتمالاً به‌عنوان یکی از پیام‌های دخیل در القاء پاسخ‌های دفاع سلولی در نظر گرفته می‌شود، فرضیه‌ای که توسط ارزیابی فعالیت‌های آنتی‌اکسیداتی سلول تایید شده است (Mohammadi et al. 2014).

با افزایش غلظت نانوذره، میزان H_2O_2 ، MDA و ELI افزایش نشان داد به‌طوری‌که در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر هر سه شاخص به حداکثر میزان خود رسید. بنابراین احتمالاً بخشی از MDA و ELI افزایش یافته در اثر غلظت‌های سمی و ROS تولید شده به‌وسیله نانوذره TiO_2 می‌باشد. تغییر الگوی میزان H_2O_2 در غلظت‌های پایین نانوذره احتمالاً دلالت بر این دارد که حضور نانوذرات TiO_2 در درون سلول هم‌زمان با افزایش H_2O_2 باعث

جدول ۱- اثر نانوذرات TiO_2 بر مراحل تقسیم میتوز در نوک ریشه نخود

تیمار نانوذره TiO_2	تکرار	تعداد سلول‌های در حال تقسیم	پروفاز	متافاز	آنافاز	تلفوز
شاهد	۱	۴۳۷	۳۹۴	۲۴	۱۴	۵
	۲	۳۵۶	۳۱۶	۲۶	۱۱	۳
	۳	۳۶۹	۳۴۸	۱۴	۶	۱
غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر	۱	۳۸۴	۳۵۴	۱۸	۷	۵
	۲	۳۷۲	۳۳۹	۲۱	۸	۴
	۳	۳۱۸	۲۹۰	۲۳	۵	۰
غلظت ۲۵ میلی‌گرم در لیتر	۱	۵۲۸	۴۸۲	۳۵	۸	۳
	۲	۴۸۹	۴۵۶	۲۴	۹	۰
	۳	۴۶۴	۴۲۵	۳۶	۲	۱
غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر	۱	۳۸۲	۳۴۷	۲۴	۹	۲
	۲	۳۴۵	۳۱۹	۱۹	۷	۰
	۳	۴۳۰	۴۰۲	۲۲	۶	۰
غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر	۱	۲۵۶	۲۴۱	۱۱	۲	۲
	۲	۳۰۴	۲۸۴	۱۶	۳	۱
	۳	۲۹۱	۲۵۸	۲۴	۶	۳
غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر	۱	۲۵۸	۲۳۵	۱۳	۶	۴
	۲	۲۶۹	۲۴۴	۱۹	۵	۱
	۳	۲۱۶	۱۹۷	۱۴	۴	۱
غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر	۱	۲۱۷	۲۰۲	۱۳	۲	۰
	۲	۲۳۸	۲۲۵	۹	۳	۱
	۳	۱۹۷	۱۸۱	۱۴	۱	۱

مشاهده نشد به‌طوری که میزان شاخص میتوزی ۲۵ درصد بود. این شاخص در غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشت با این حال میزان شاخص میتوزی پس از افزایش معنی‌دار در غلظت ۲۵ میلی‌گرم در لیتر، روند کاهش تدریجی را نشان داد به‌طوری که کم‌ترین میزان این شاخص در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد (۱۴ درصد در مقایسه با شاهد) (شکل ۴). اثر نانوذرات TiO_2 بر شاخص میتوز، شاخص انحرافات کروموزومی و شاخص آنافاز معنی‌دار شد در حالی که بر شاخص‌های متافاز و تلوفاز معنی‌دار نشد (جدول ۳). کاهش شاخص میتوزی ممکن است به علت پارگی و بافت مردگی ایجاد شده در سلول‌ها باشد که احتمالا در اثر ROSها رخ می‌دهد و باعث از بین رفتن و مرگ سلولی می‌شود (Bianchi et al. 2016).



شکل ۴- الگوی تغییر شاخص میتوز تحت تیمارهای غلظت نانوذره TiO_2 در ریشه نخود زراعی. حروف مختلف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن است.

در این مطالعه نانوذره TiO_2 در غلظت‌های پایین‌تر از ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر سمیت سلولی نشان نداد در حالی که در غلظت‌های بالاتر سمیت سلولی آن‌ها مشاهده شد. در گیاهان شاهد (بدون تیمار با نانوذره) هیچ‌گونه اختلالات کروموزومی

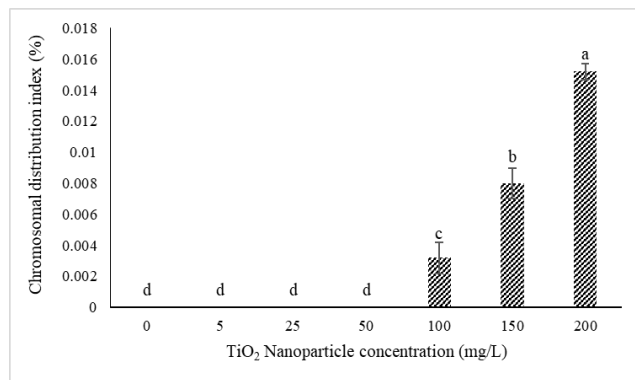
جدول ۲- اثر نانوذرات TiO_2 بر تقسیم سلولی و به هم ریختگی کروموزوم‌ها در نوک ریشه نخود

تیمار نانوذره TiO_2	تکرار	تعداد سلول‌های شمارش شده	متافاز نرمال	آنافاز نرمال	کروموزوم چسبیده	متافاز به هم ریخته	آنافاز به هم ریخته	تلوفاز به هم ریخته
شاهد	۱	۱۵۰۰	+	+	-	-	-	-
	۲	۱۵۰۰	+	+	-	-	-	-
	۳	۱۵۰۰	+	+	-	-	-	-
غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر	۱	۱۵۰۰	+	+	-	-	-	-
	۲	۱۵۰۰	+	+	-	-	-	-
	۳	۱۵۰۰	+	+	-	-	-	-
غلظت ۲۵ میلی‌گرم در لیتر	۱	۱۵۰۰	+	+	-	-	-	-
	۲	۱۵۰۰	+	+	-	-	-	-
	۳	۱۵۰۰	+	+	-	-	-	-
غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر	۱	۱۵۰۰	+	+	-	-	-	-
	۲	۱۵۰۰	+	+	-	-	-	-
	۳	۱۵۰۰	+	+	-	-	-	-
غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر	۱	۱۵۰۰	+	+	-	-	-	+
	۲	۱۵۰۰	+	+	-	+	-	-
	۳	۱۵۰۰	+	+	-	+	-	+
غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر	۱	۱۵۰۰	+	+	+	+	+	+
	۲	۱۵۰۰	+	+	+	+	+	+
	۳	۱۵۰۰	+	+	+	+	+	+
غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر	۱	۱۵۰۰	+	+	+	+	+	+
	۲	۱۵۰۰	+	+	+	+	+	+
	۳	۱۵۰۰	+	+	+	+	+	+

جدول ۳- جدول تجزیه واریانس اثر نانوذرات TiO_2 بر شاخص‌های تقسیم سلولی و خسارت فیزیولوژیک در نوک ریشه نخود

منابع تغییر	درجه آزادی	شاخص میتوزی	شاخص متافاز	شاخص آنافاز	شاخص تولفاز	شاخص انحراف	میانگین مربعات		
							شاخص انحراف آنافاز	شاخص انحراف متافاز	شاخص انحراف آنافاز
تیمار	۶	۰/۰۱۲ ^{ns}	۰/۰۰۰۳ ^{ns}	۰/۰۰۰۱ [*]	۰/۰۰۰۰۲ ^{ns}	۰/۰۰۰۱ ^{ns}	۰/۵۲۳ ^{ns}	۲/۵۵ ^{ns}	۲۰۹۳/۴۴ ^{ns}
خطا	۱۴	۰/۰۰۰۴	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۰۰۳	۰/۰۰۰۰۱	۰/۰۰۰۰۰۳	۰/۰۱۹	۰/۰۰۴	۳۵/۱۳
//CV		۹/۸۴	۲۵/۱۴	۳۴/۰۴	۱۴/۸۵	۲۹/۵۶	۲۸/۳	۳۱/۴	۵/۷۴
							۷/۸۴	۱۱/۸۷	۱۱/۸۷

دو اختلالات فیزیولوژیک در نوک ریشه، صدمات ماده ژنتیکی و DNA^۱ در کروموزم‌ها در غلظت‌های بالای نانوذره مانند متافاز چسبندگی کروموزومی در مراحل متافاز و آنافاز مشاهده شد. مطالعات زیادی نشان داده که کاهش چرخه میتوز ممکن است به علت تغییر در زمان چرخه سلولی یا در اثر افزایش زمان فازهای مختلف چرخه سلولی باشد. کاهش شاخص میتوزی احتمالاً به سبب اثرات غلظت بالای سمیت نانوذره TiO_2 بوده و احتمالاً از میتوز طبیعی به علت جلوگیری از ورود سلول‌ها به مرحله جدید میتوزی جلوگیری می‌کند (Ghosh et al. 2016)، در نتیجه تعداد کل چرخه سلولی کاهش می‌یابد. به کارگیری غلظت‌های بالای ۱۰۰ میلی گرم در لیتر نانوذرات TiO_2 ، احتمالاً اختلالات مختلف کروموزومی ایجاد می‌کند (شکل ۷). نتایج نشان داد که این اختلالات شامل چسبندگی، شکستگی و متافاز به هم ریخته در سلول‌های تیمار شده با نانوذره TiO_2 بودند.



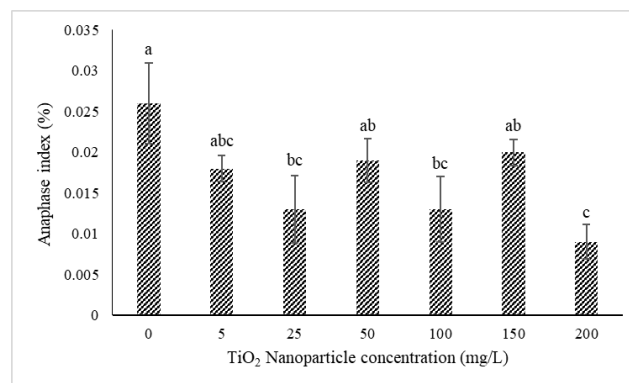
شکل ۵- الگوی تغییر شاخص انحرافات کروموزومی تحت تیمارهای غلظت نانوذره TiO_2 در ریشه نخود زراعی. حروف مختلف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن است.

در غلظت ۲۰۰ میلی گرم در لیتر بیشترین شاخص انحرافات کروموزومی مشاهده شد که بیانگر اختلالات فیزیولوژیکی بیوشیمیایی القا شده توسط غلظت‌های سمی نانوذره TiO_2 می‌باشد. در نمونه‌های شاهد و غلظت‌های ۵، ۲۵ و ۵۰ میلی گرم در لیتر هیچ گونه متافاز، آنافاز و تولفاز بهم ریخته مشاهده نشد در حالی که در غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر تولفاز به هم ریخته و در غلظت ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی گرم در لیتر آنافاز، متافاز و تولفاز به هم ریخته مشاهده شد (جدول ۲). نانوذره TiO_2 در غلظت‌های ۱۰۰ و بالاتر از ۱۰۰ میلی گرم در لیتر سبب کاهش معنی‌دار در شاخص میتوزی در مقایسه با شاهد شد (شکل ۴). به نظر می‌رسد که غلظت‌های بالای TiO_2 با اثر سمی بر سلول ممکن است باعث اختلال در چرخه میتوز شود. اختلالات کروموزومی تغییر در ساختار کروموزوم محسوب شده که از شکستگی، پیوستگی یا تبادل قطعات کروموزومی به وجود می‌آید (Kumari et al. 2009). شکستگی کروموزوم‌ها در نتیجه ایجاد ROSها گزارش شده است. احتمال دارد غلظت‌های بالای نانوذره TiO_2 به علت تجمع ROS منجر به شکستن قطعات کروموزومی شده که در نهایت سبب اختلال کروموزوم‌ها شده باشد (Bianchi et al. 2016). پیوستگی کروموزوم‌ها اختلالی برگشت ناپذیر بوده که می‌تواند منجر به مرگ سلولی شود (Bianchi et al. 2016) که این مطلب از کاهش شاخص میتوزی تایید می‌شود. گزارش شده که تولید ROS علاوه بر اینکه باعث پراکسیداسیون لیپیدی و تغییر سیالیت غشا می‌شود همچنین باعث القا صدمه در DNA می‌شود (Mohammadi et al. 2013). در پاسخ به این صدمات معمولاً چرخه تقسیم سلولی میتوز مخصوصاً در مرحله G1 و G2 به تاخیر می‌افتد تا اینکه به سلول اجازه دهد قبل از شروع همانند سازی و یا قبل از شروع میتوز فرایند تعمیر مولکولی انجام دهد (Feng et al. 2011). هر

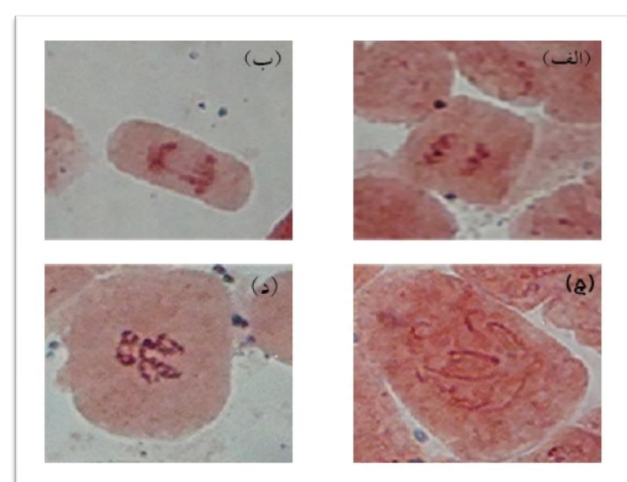
¹ Clastogenic

به اندامک‌های سلولی مانند میتوکندری و هسته باعث اختلال در تنفس و افزایش تنش اکسیداتیو شده است (Li et al. 2003). در سلول‌های مریستم ریشه ذرت در حضور hydroxide Tetramethylammonium که با نانوذرات مغناطیسی پوشش‌دار شده بودند اختلالات کروموزومی مشاهده شد (Racuciu and Creanga 2007). بنابراین به نظر می‌رسد که اختلالات کروموزومی و تغییر در ویژگی‌های میتوزی در اثر سمیت نانوذرات در این تحقیق باشد. سمیت نانوذرات ممکن است در اثر ترکیبات شیمیایی یعنی یون‌های سمی آزاد شده به محیط؛ یا در اثر تنش یا تحریک ایجاد شده به وسیله سطح، اندازه و یا شکل نانوذرات رخ دهد (Brunner et al. 2006). برخی مطالعات نشان داده‌اند که میزان حلالیت نانوذرات اکسید شده به میزان چشمگیری پاسخ‌های سلول‌های کشت شده را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Brunner et al. 2006). بنابراین در مطالعه اثر نانوذرات بر پاسخ‌های سلولی باید انتقال و جذب آن‌ها به وسیله سلول و همچنین سمیت سلولی، سمیت ژنومی^۱ و فیزیکوشیمیایی آن‌ها، در نظر گرفته شود.

نتایج این آزمایشات نشان داد که غلظت‌های بالای نانوذره TiO_2 در نخود ممکن است با صدمات و خسارت سلول همراه باشد. از طرف دیگر غلظت‌های پایین نانوذره TiO_2 (۵ میلی‌گرم در لیتر) باعث تنش اکسیداتیو نشده است. غلظت نانوذره TiO_2 ۲۵ میلی‌گرم در لیتر سبب افزایش معنی‌دار H_2O_2 شده اما چنین افزایشی سبب تشدید شاخص‌های خسارت نشد، به نظر می‌رسد القا میزان H_2O_2 سبب فعال‌سازی مکانیسم‌های پیام‌دهی در سلول شده‌است، نتایجی که با افزایش حداکثر شاخص میتوز در این غلظت و عدم افزایش شاخص‌های خسارت تائید می‌شود. غلظت‌های بالای ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذره صدمات جدی فیزیولوژیکی و سیتوژنتیکی در گیاه نخود ایجاد کرد. تمام فرضیات در نظر گرفته شده اثرات نانوذره TiO_2 بر اساس اثرات شیمیایی نانوذره بوده و جنبه‌های اثر فیزیکی نانوذره به تحقیقات بیشتر نیاز دارد. پیشنهاد می‌شود از غلظت‌های پایین نانوذره TiO_2 در کشاورزی استفاده شود.



شکل ۶- الگوی تغییر شاخص آنافاز تحت تیمارهای غلظت نانوذره TiO_2 در ریشه نخود زراعی. حروف مختلف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن است.



شکل ۷- الف: تلوفاز طبیعی (کنترل یا شاهد)، ب: آنافاز به هم‌ریخته تحت تاثیر تیمار نانوذره TiO_2 (غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر)، ج: متافاز به هم‌ریخته تحت تاثیر تیمار نانوذره TiO_2 (غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر)، د: تلوفاز به هم‌ریخته تحت تاثیر تیمار نانوذره TiO_2 (غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر)

مطالعات نشان داده که اختلالات کروموزومی می‌تواند در هستک‌های سلولی باشد. وقوع انحرافات کروموزومی نشان‌دهنده اثرات سوء نانوذره TiO_2 بر سلول‌های گیاهی است. چسبیدگی کروموزومی که یکی از دلایل اصلی اختلالات کروموزومی است ممکن است در اثر تجزیه یا از هم‌پاشیدگی کروموزومی یا در نتیجه چسبیدگی فیبرهای درونی کروماتین کروموزوم‌ها، متراکم شدن DNA، اختلال در بسته‌بندی کروموزوم، اختلال در عملکرد دوک‌ها باشد (Asita and Mokhobo 2013). تمام این اختلالات در تقسیم سلولی می‌تواند اثرات منفی فراوانی به دنبال داشته باشد (Bonciu et al. 2018). در سلول‌های پستانداران نفوذ نانوذرات

¹ Genotoxic

منابع

- Asita AO, Mokhobo MM (2013) Clastogenic and cytotoxic effects of four pesticides used to control insect pests of stored products on root meristems of *Allium cepa*. Environmental Natural Resources Research 3:133-145.
- ASTM C (2012) 1202: Standard test method for electrical indication of concrete's ability to resist chloride ion penetration. Annual Book of ASTM Standards 4:7.
- Atha DH, Wang H, Petersen EJ, Cleveland D, Holbrook RD, Jaruga P, Dizdaroglu M, Xing B, Nelson BC (2012) Copper oxide nanoparticle mediated DNA damage in terrestrial plant models. Environmental Science and Technology 46:1819-1827.
- Barik TK, Sahu B, Swain V (2008) Nanosilica-from medicine to pest control. Parasitology Research 103:253.
- Bates LS, Waldren RP, Teare ID (1973) Rapid determination of proline for water stress studies. Plant and Soil 39: 205-208.
- Berahmand AA, Panahi AG, Sahabi H, Feizi H, Moghaddam PR, Shahtahmassebi N, Fotovat A, Karimpour H, Galleghir O (2012) Effects silver nanoparticles and magnetic field on growth of fodder maize (*Zea mays* L.). Biological Trace Element Research 149:419-24.
- Bhatta P, Sakya SR (2008) Study of mitotic activity and chromosomal behaviour in root meristem of *Allium cepa* L. treated with magnesium sulphate. Ecoprint15:83-88.
- Bianchi J, Fernandes TC, Marin-Morales MA (2016) Induction of mitotic and chromosomal abnormalities on *Allium cepa* cells by pesticides imidacloprid and sulfentrazone and the mixture of them. Chemosphere 144:475-483.
- Bonciu E, Roşculete E, Olaru AL, Roşculete CA (2018) Evaluation of the mitodepressive effect, chromosomal aberrations and nuclear abnormalities induced by urea fertilization in the meristematic tissues of *Allium cepa* L. Caryologia 71:350-6.
- Brunner TJ, Wick P, Manser P, Spohn P, Grass RN, Limbach LK, Bruinink A, Stark WJ (2006) In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility. Environmental Science and Technology 40:4374-4381.
- Castiglione MR, Giorgetti L, Geri C, Cremonini R (2011) The effects of nano- TiO_2 on seed germination, development and mitosis of root tip cells of *Vicia narbonensis* L. and *Zea mays* L. Journal of Nanoparticle Research 13:2443-9.
- Das K, Roychoudhury A (2014) Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. Frontiers in Environmental Science 2:53.
- Feizi H, Moghaddam PR, Shahtahmassebi N, Fotovat A (2012) Impact of bulk and nanosized titanium dioxide (TiO_2) on wheat seed germination and seedling growth. Biological Trace Element Research 146:101-6.
- Feng H, Cheng AS, Tsang DP, Li MS, Go MY, Cheung YS, Zhao GJ, Ng SS, Lin MC, Yu J, Lai PB (2011) Cell cycle-related kinase is a direct androgen receptor-regulated gene that drives β -catenin/T cell factor-dependent hepatocarcinogenesis. Journal of Clinical Investigation 121:3159-3175.
- Gajbhiye M, Kesharwani J, Ingle A, Gade A, Rai M (2009) Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their activity against pathogenic fungi in combination with fluconazole. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine 5:382-6.
- Ghosh M, Sinha S, Jothiramajayam M, Jana A, Nag A, Mukherjee A (2016) Cyto-genotoxicity and oxidative stress induced by zinc oxide nanoparticle in human lymphocyte cells in vitro and Swiss albino male mice in vivo. Food and Chemical Toxicology 97:286-296.
- Hasanpour H, Maali-Amir R, Zeinali H (2015) Effect of TiO_2 nanoparticles on metabolic limitations to photosynthesis under cold in chickpea. Russian Journal of Plant Physiology 62:779-87.
- Jaberzadeh A, Moaveni P, Moghadam HR, Zahedi H (2013) Influence of bulk and nanoparticles titanium foliar application on some agronomic traits, seed gluten and starch contents of wheat subjected to water deficit stress. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca 41:201-7.
- Keller AA, McFerran S, Lazareva A, Suh S (2013) Global life cycle releases of engineered nanomaterials. Journal of Nanoparticle Research 15:1692.
- Khodakovskaya MV, De Silva K, Biris AS, Dervishi E, Villagarcia H (2012) Carbon nanotubes induce growth enhancement of tobacco cells. ACS Nano 6(3):2128-35.
- Khodakovskaya MV, de Silva K, Nedosekin DA, Dervishi E, Biris AS, Shashkov EV, Galanzha EI, Zharov VP (2011) Complex genetic, photothermal, and photoacoustic analysis of nanoparticle-plant interactions. Proceedings of the National Academy of Sciences 108:1028-33.
- Kiapour H, Moaveni P, Habibi D, Sani B (2015) Evaluation of the application of gibberellic acid and titanium dioxide nanoparticles under drought stress on some traits of basil (*Ocimum basilicum* L.). International Journal of Agronomy and Agriculture Research 6:138-50.
- Kumari M, Mukherjee A, Chandrasekaran N (2009) Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. Science of the Total Environment 407:5243-6.
- Landmann M, Rauls E, Schmidt WG (2012) The electronic structure and optical response of rutile, anatase and brookite TiO_2 . Journal of Physics: Condensed Matter 24:195503.
- Li N, Sioutas C, Cho A, Schmitz D, Misra C, Sempf J, Wang M, Oberley T, Froines J, Nel A (2003) Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. Environmental Health Perspectives 111:455-460.
- Lin D, Xing B (2007) Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. Environmental Pollution 150:243-250.
- Liu X, Liu MH, Luo YC, Mou CY, Lin SD, Cheng H, Chen JM, Lee JF, Lin TS (2012) Strong metal-support interactions between gold nanoparticles and ZnO nanorods in CO oxidation. Journal of the American Chemical Society 134:10251-8.

- Loreto F, Velikova V (2001) Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. *Plant Physiology* 127:1781-1787.
- Mohammadi R, Maali-Amiri R, Abbasi A (2013) Effect of TiO_2 nanoparticles on chickpea response to cold stress. *Biological Trace Element Research* 152:403-10.
- Mohammadi R, Maali-Amiri R, Mantri NL (2014) Effect of TiO_2 nanoparticles on oxidative damage and antioxidant defense systems in chickpea seedlings during cold stress. *Russian Journal of Plant Physiology* 61:768-75.
- Murphy B, Steckler T (2004) Murphy Brook Chandler and Steckler Todd C. *Physical mode of action pesticide*. U.S. Patent Application 10:463-955.
- Nair R, Varghese SH, Nair BG, Maekawa T, Yoshida Y, Kumar DS (2010) Nanoparticulate material delivery to plants. *Plant Science* 179(3):154-63.
- Navarro E, Piccapietra F, Wagner B, Marconi F, Kaegi R, Odzak N, Sigg L, Behra R (2008) Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Sciences Technology* 42:8959-8964.
- Nel A, Xia T, Ma'dler L, Li N (2006) Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311: 622-627.
- Ozyigit II, Filiz E, Vatansever R, Kurtoglu KY, Koc I, Öztürk MX, Anjum NA (2016) Identification and comparative analysis of H_2O_2 -scavenging enzymes (ascorbate peroxidase and glutathione peroxidase) in selected plants employing bioinformatics approaches. *Frontier Plant Sciences* 7:301.
- Peralta-Videa JR, Zhao L, Lopez-Moreno ML, de la Rosa G, Hong J, Gardea-Torresdey JL (2011) Nanomaterials and the environment: a review for the biennium 2008-2010. *Journal of hazardous materials* 186:1-5.
- Pérez-de-Luque A, Rubiales D (2009) Nanotechnology for parasitic plant control. *Pest Management Science: Formerly Pesticide Science* 65:540-5.
- Popov VN, Orlova IV, Kipaikina NV, Serebriiskaya TS, Merkulova NV, Nosov AM, Trunova TI, Tsydendambaev VD, Los AD (2005) The effect of tobacco plant transformation with a gene for acyl lipid $\Delta 9$ -desaturase from *Synechococcus vulcanus* on plant chilling tolerance. *Russian Journal of Plant Physiology* 52: 664-667.
- Prasad R, Kumar V, Prasad KS (2014) Nanotechnology in sustainable agriculture: present concerns and future aspects. *African Journal of Biotechnology* 13(6):705-13.
- Racuciu M, Creanga DE (2007) TMA-OH coated magnetic nanoparticles internalized in vegetal tissue. *Romanian Journal of Physics* 52:395.
- Rico CM, Hong J, Morales MI, Zhao L, Barrios AC, Zhang JY, Peralta-Videa JR, Gardea-Torresdey JL (2013) Effect of cerium oxide nanoparticles on rice: a study involving the antioxidant defense system and in vivo fluorescence imaging. *Environmental Sciences and Technology* 47:5635-5642.
- Scrini G, Lyons K (2007). The emerging nano-corporate paradigm: nanotechnology and the transformation of nature, food and agri-food systems. *International Journal of Sociology of Food and Agriculture* 15: 22-44.
- Servin AD, White JC (2016) Nanotechnology in agriculture: next steps for understanding engineered nanoparticle exposure and risk. *NanoImpact* 1:9-12.
- Siddiqi KS, Husen A (2016) Fabrication of metal and metal oxide nanoparticles by algae and their toxic effects. *Nano Research Letters* 11:363.
- Siddiqui MH, Al-Whaibi MH (2014) Role of nano- SiO_2 in germination of tomato (*Lycopersicon esculentum* seeds Mill.). *Saudi Journal of Biological Sciences* 21:13-7.
- Singh D, Kumar S, Singh SC, Lal B, Singh NB (2012) Applications of liquid assisted pulsed laser ablation synthesized TiO_2 nanoparticles on germination, growth and biochemical parameters of *Brassica Oleracea* var. Capitata. *Science of Advanced Materials* 4:522-31.
- Suriyaprabha R, Karunakaran G, Yuvakkumar R, Prabu P, Rajendran V, Kannan N (2012a) Growth and physiological responses of maize (*Zea mays* L.) to porous silica nanoparticles in soil. *Journal of Nanoparticle Research* 14:1294.
- Suriyaprabha R, Karunakaran G, Yuvakkumar R, Rajendran V, Kannan N (2012b) Silica nanoparticles for increased silica availability in maize (*Zea mays* L.) seeds under hydroponic conditions. *Current Nanoscience* 8:902-8.
- Wei C, Zhang Y, Guo J, Han B, Yang X, Yuan J (2010) Effects of silica nanoparticles on growth and photosynthetic pigment contents of *Scenedesmus obliquus*. *Journal of Environmental Sciences* 22:155-60.
- Weir A, Westerhoff P, Fabricius L, Hristovski K, von Goetz N (2012) Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. *Environmental Science and Technology* 46:2242-2250.
- Zhang FQ, She WJ, Fu YF (2005) Effect of nano-silver on cell division and mitotic chromosomes: a preface to a siren. *Geneva* 40:504-509.
- Zheng JS, Sun CZ, Zhang SN, Hou XL, Bonnema G (2016) Cytogenetic diversity of simple sequence repeats in morphotypes of *Brassica rapa* ssp. chinensis. *Frontiers in Plant Science* 7:1049.