

## 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<sup>۱</sup>، رضا معالی امیری<sup>۱\*</sup>، رحمت محمدی<sup>۲</sup>

۱- به ترتیب 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 Y<sup>1</sup>, Maali-Amiri R<sup>\*1</sup>, Mohammadi R<sup>2</sup>

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 میلی‌گرم نانوذره در لیتر مطالعه شد. در گیاهان شاهد هیچ‌گونه 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 میلی‌گرم در لیتر که بیشترین میزان شاخص میتوزی را داشت. پایین‌ترین میزان شاخص میتوزی (۱۴ درصد) در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم 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 میلی‌گرم در لیتر هیچ‌گونه متافاز، آنافاز و تلوفاز بهم ریخته مشاهده نشد در حالی که در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر تلوفاز بهم ریخته و در غلظت ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنافاز، متافاز و تلوفاز بهم ریخته مشاهده شد. تیمار نانوذره در غلظت‌های پایین (۵ میلی‌گرم در لیتر) تغییر معنی‌داری در شاخص‌های سیتوژنتیکی و فیزیولوژیکی ایجاد نکرد. غلظت‌های بالاتر از ۱۰۰ میلی‌گرم 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 (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 (ENPs<sup>۱</sup>) بر پایه فلز یا کربن (CNTs<sup>۲</sup>) هستند (Peralta-Videa et al. 2011). نانوذرات ساخته شده بر پایه کربن شامل فلورین<sup>۳</sup> و نانوتیوب (نانوتیوب‌های کربنی تک دیواره (SWCNT)<sup>۴</sup> و نانوتیوب‌های کربنی چند دیواره (MWCNT)<sup>۵</sup>) هستند، نانوذرات فلزی به گروه‌های فلزات اکسیدهای فلز و نقاط کوانتومی (QDs)<sup>۶</sup> 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<sup>۸</sup>، آناتاز<sup>۹</sup> و بروکیت<sup>۱۰</sup> 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 به‌عنوان فوتوکاتالیزور به‌کار می‌روند (Landmann et al. 2012). به‌علت تولید فراوان و رهاسازی نانو مواد 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 نانو مواد 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 به‌طور مؤثر در آماده‌سازی فرمول‌های جدید حشره‌کش‌ها، آفت‌کش‌ها و دفع‌کننده‌های حشرات استفاده می‌شوند (Barik et al. 2008; Gajbhiye et al. 2009). نانوتیوب رس<sup>۱۱</sup> به‌عنوان حامل حشره‌کش، انتشار گسترده آن و تماس بهتر حشره‌کش با گیاه را ایجاد کرده به‌طوری‌که 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<sup>۱۲</sup> مؤثر کودها، حشره‌کش‌ها، علف‌کش‌ها، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و غیره استفاده شوند (Prasad et al. 2014). نانو مواد (NMs)<sup>۱۳</sup> در زمینه بیوتکنولوژی محصولات کشاورزی برای اصلاح محصولات زراعی استفاده شده است. NMs به‌عنوان 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

<sup>8</sup> Rutile<sup>9</sup> Anatase<sup>10</sup> Brookite<sup>11</sup> Clay nanotube<sup>12</sup> Delivery<sup>13</sup> Nanomaterials<sup>1</sup> Nanoparticles (NPs)<sup>2</sup> Engineered nanoparticles<sup>3</sup> Carbon nanotubes<sup>4</sup> Fullerene<sup>5</sup> Single-walled-CNTs<sup>6</sup> Multi-walled-CNTs<sup>7</sup> Quantum dots

واکنش‌هایی شناسایی نشده اما به نظر می‌رسد این اثرات به علت ویژگی شیمیایی نانوذرات یا به علت برهم‌کنش آن‌ها با آنزیم‌ها باشد. ثابت شده نانوذرات  $SiO_2$  سبب افزایش رشد جوانه‌زنی، رشد گیاهان، تغییر وزن خشک، القا سنتز کلروفیل و برخی ویژگی‌های متابولیسم در موجودات فتوسنتز شده است (Suriyaprabha et al. 2012a, b; Siddiqui and Al-Whaibi 2014). افزایش عملکرد در مطالعات صورت گرفته به علت 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 میکروارگانیسم‌ها دارند (Navarro et al. 2008; Siddiqui and Husen 2016). جذب و تجمع نانومواد در گیاهان ممکن است طول ساقه را افزایش دهد در حالی که طول و تعداد ریشه‌ها را به علت 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 به طور معمول طی مرحله جوانه‌زنی با استفاده از شاخص‌های خسارت سلولی مانند ELI، MDA،  $H_2O_2$ ، سمیت سلولی<sup>2</sup> و اثرات مخرب آن بر DNA و تقسیم میتوز (Khodakovskaya et al. 2011 and

استفاده از این نانوذرات می‌تواند در بهبود ویژگی‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاهان نیز به کار 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 میکروارگانیسم‌ها، سلول‌های جانوری و انسانی انجام گرفته (Zhang et al. 2005; Feizi et al. 2012) اما گیاهان به دلیل 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 آنتی‌اکسیدانی را افزایش داده و بیان *microRNAs* تنظیم‌کننده خصوصیات مورفولوژیکی، فیزیولوژی و متابولیسم در گیاهان را تغییر می‌دهد (Siddiqui 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 به نظر می‌رسد سلول‌های گیاهی از طریق آنتی‌اکسیدان‌های 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 به طوری 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. به طور مثال نانوذرات  $CeO_2$ ،  $Fe_3O_4$  و  $Co_3O_4$  فعالیت 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

<sup>2</sup> Cytotoxicity<sup>1</sup> 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<sup>۲</sup>، متافاز به‌هم‌ریخته<sup>۳</sup>، تلوفاز به‌هم‌ریخته<sup>۴</sup>، شاخص میتوزی<sup>۵</sup> (تعداد سلول‌های در حال تقسیم بر تعداد کل سلول‌ها)، شاخص متافازی<sup>۶</sup> (تعداد سلول‌های متافازی بر تعداد سلول‌های در حال تقسیم)، شاخص آنافازی<sup>۷</sup> (تعداد سلول‌های آنافازی بر تعداد سلول‌های در حال تقسیم) شاخص انحراف کروموزومی<sup>۸</sup> (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  $4^{\circ}C$  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 لویتسکی<sup>۱</sup> 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 هماتوکسیلین در دمای اتاق قرار داده شدند (Zheng et al. 2016). دو میلی‌متر از نوک ریشه جدا و بر روی لام قرار داده 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  $10$

<sup>1</sup> Levitsky

<sup>2</sup> Abnormal anaphase

<sup>3</sup> Abnormal metaphase

<sup>4</sup> Abnormal telophase

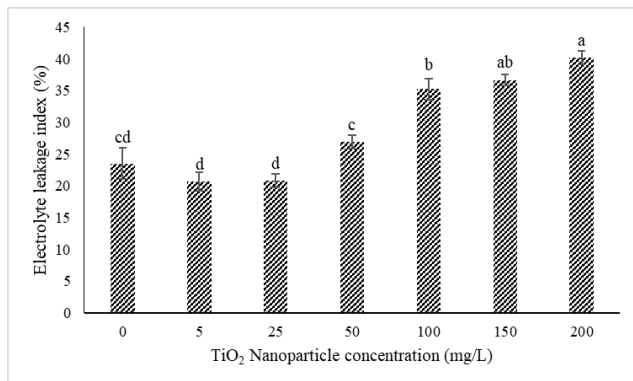
<sup>5</sup> Mitotic index

<sup>6</sup> Metaphase index

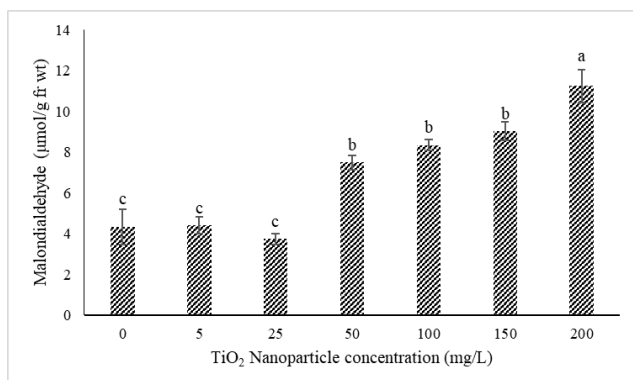
<sup>7</sup> Anaphase index

<sup>8</sup> Chromosomal distribution index

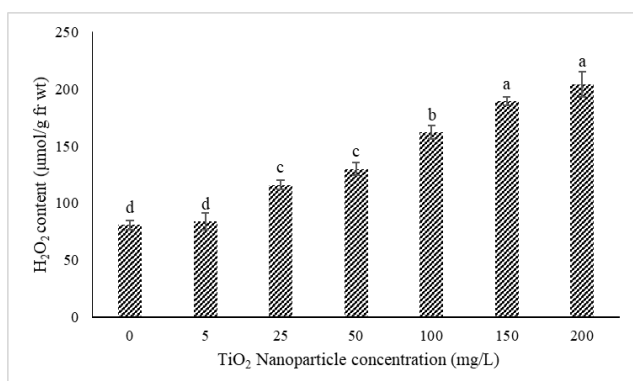
نبود. به نظر می‌رسد که غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر تولید تنش اکسیداتیو در ریشه نخود نمی‌کند.



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 ( $EC_1$ ) با استفاده از دستگاه  $EC$  متر (Inolab, آلمان) قرائت شد. در مرحله دوم میزان هدایت الکترولیتی ( $EC_2$ ) 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  $I=EC_1/EC_2*100$  محاسبه شد (Popov et al. 2005).

جهت اندازه‌گیری پراکسیداسیون غشا سلولی ۰/۲ گرم از بافت تازه برگ‌های توپین 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 تیوباربتوریک اسید (TBA) در ۱۰۰ گرم بود، اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با  $4000g$  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 می‌تواند ساختار غشای پلاسمایی را در برابر صدمات ROSها 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).

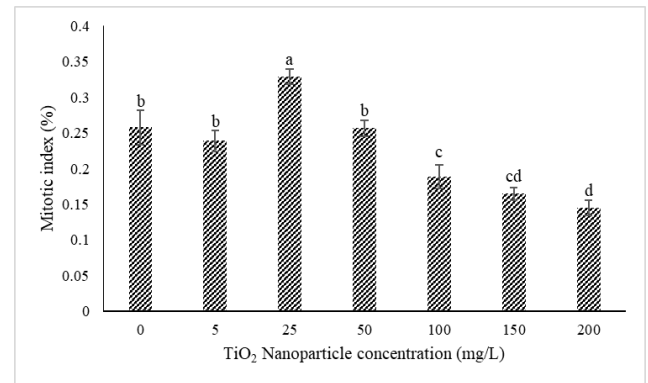
با این وجود در غلظت ۲۵ میلی‌گرم در لیتر، میزان  $H_2O_2$  افزایش معنی‌دار در مقایسه با شاهد داشت. در حالی که شاخص‌های MDA و ELI در مقایسه با شاهد افزایش معنی‌داری نشان ندادند. نظر به اینکه شاخص‌های ELI و MDA اغلب متعاقب افزایش میزان ROSها نشان‌دهنده خسارت سلولی هستند لذا به نظر می‌رسد این افزایش  $H_2O_2$  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 آنتی‌اکسیداتیو سلول تایید شده است (Mohammadi et al. 2014).

با افزایش غلظت نانوذره، میزان  $H_2O_2$ ، MDA و ELI افزایش نشان داد به طوری که 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 به وسیله 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	تلوفاز
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 به طوری 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 به طوری 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 احتمالاً 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

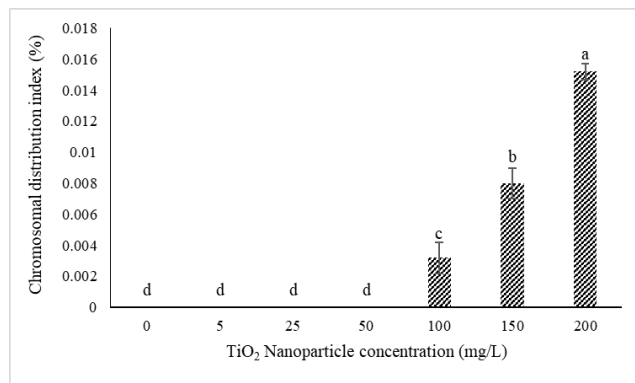
جدول ۲- اثر نانوذرات  $TiO_2$  بر تقسیم سلولی و به هم‌ریختگی کروموزوم‌ها در نوک ریشه نخود

تیمار نانوذره $TiO_2$	تکرار	تعداد سلول‌های شمارش شده	متافاز نرمال	آنافاز نرمال	کروموزوم چسبیده	متافاز به هم‌ریخته	آنافاز به هم‌ریخته	تلوفاز به هم‌ریخته
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

میانگین مربعات										
منابع تغییر	درجه آزادی	شاخص میتوزی	شاخص متافاز	شاخص آنافاز	شاخص تلوفاز	شاخص انحراف	شاخص انحراف متافاز	شاخص انحراف آنافاز	$H_2O_2$	MDA
تیمار	۶	۰/۰۱۲ <sup>***</sup>	۰/۰۰۰۳ <sup>NS</sup>	۰/۰۰۰۱*	۰/۰۰۰۰۲ <sup>NS</sup>	۰/۰۰۰۱ <sup>***</sup>	۲/۵۵ <sup>***</sup>	۰/۵۲۳ <sup>NS</sup>	۲۰۹۳/۴۴ <sup>***</sup>	۶۵/۵۷
خطا	۱۴	۰/۰۰۰۴	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۰۰۳	۰/۰۰۰۰۱	۰/۰۰۰۰۰۳	۰/۰۰۴	۰/۱۹	۳۵/۱۳	۱/۰۹
/CV		۹/۸۴	۲۵/۱۴	۳۴/۰۴	۱۴/۸۵	۲۹/۵۶	۳۱/۴	۲۸/۳	۵/۷۴	۱۱/۸۷

دو اختلالات فیزیولوژیک در نوک ریشه، صدمات ماده ژنتیکی و DNA در کروموزوم‌ها 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 میلی‌گرم 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 هم‌ریخته 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.

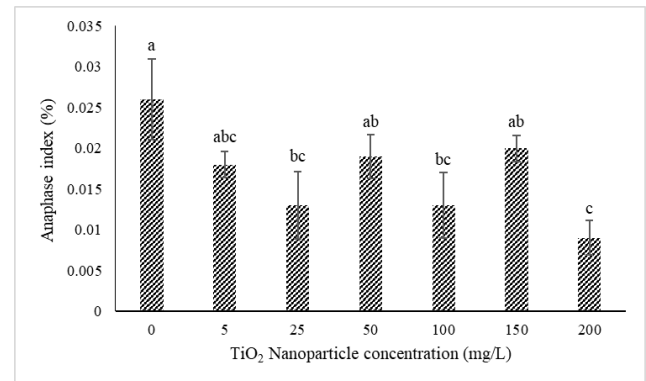
در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر بیشترین شاخص انحرافات کروموزومی مشاهده شد که بیانگر اختلالات فیزیولوژیک بیوشیمیایی القا شده توسط غلظت‌های سمی نانوذره  $TiO_2$  می‌باشد. در نمونه‌های شاهد و غلظت‌های ۵، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر هیچ‌گونه متافاز، آنافاز و تلوفاز بهم ریخته مشاهده نشد در حالی که در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر تلوفاز به هم‌ریخته و در غلظت ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنافاز، متافاز و تلوفاز به هم‌ریخته مشاهده شد (جدول ۲). نانوذره  $TiO_2$  در غلظت‌های ۱۰۰ و بالاتر از ۱۰۰ میلی‌گرم 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

<sup>1</sup> Clastogenic

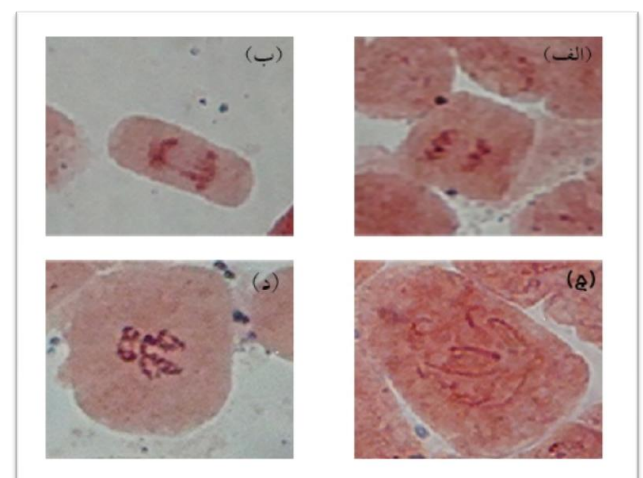


به اندامک‌های سلولی مانند میتوکندری و هسته باعث اختلال در تنفس و افزایش تنش اکسیداتیو شده است (Li et al. 2003). در سلول‌های مریستم ریشه ذرت در حضور hydroxide Tetramethylammonium که با نانوذرات مغناطیسی پوشش‌دار شده بودند اختلالات کروموزومی مشاهده شد (Racuciu and Creanga 2007). بنابراین به نظر می‌رسد 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<sup>۱</sup> 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 پیام دهی 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 به‌هم‌ریخته تحت تاثیر تیمار نانوذره  $TiO_2$  (غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر)، ج: متافاز به‌هم‌ریخته تحت تاثیر تیمار نانوذره  $TiO_2$  (غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر)، د: تلوفاز به‌هم‌ریخته 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

<sup>1</sup> 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, Gallehgir 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. Ecoprint 15:83-88.
- 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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub>) 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  $\beta$ -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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub>. 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  $\text{TiO}_2$  nanoparticles on chickpea response to cold stress. *Biological Trace Element Research* 152:403-10.
- Mohammadi R, Maali-Amiri R, Mantri NL (2014) Effect of  $\text{TiO}_2$  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, Vatansver R, Kurtoglu KY, Koc I, Öztürk MX, Anjum NA (2016) Identification and comparative analysis of  $\text{H}_2\text{O}_2$ -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- $\text{SiO}_2$  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  $\text{TiO}_2$  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 pre-tort 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.