ارزیابی جذب، انتقال و تجمع نانوذرات مگنتیت از محلول غذایی با پردازش سیگنال‌های مغناطیسی در سویا

محمد هادی غفاریان مقرب[۱*]، مرتضی محمودی[۲] و محمد جعفر ملکوتی[۱]

(تاریخ دریافت: ۹۲/۲/۱۵ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۲/۹/۴)

چکیده

تاکنون تحقیقات اندکی در باره جذب و انتقال نانوذرات توسط گیاهان صورت گرفته است. برای ارزیابی چنین فرایندهایی، دانهال سویا (*Glycine max* L.) در محلول غذایی حاوی ۶۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات مگنتیت کشت گردید و محلول غذایی حاوی کلات آهن (Fe-EDTA) با غلظت ۳۳ میلی‌گرم در لیتر به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. پس از ۲۸ روز، شدت سیگنال مغناطیسی در اندام‌های مختلف سویا با دستگاه مغناطیس‌سنج نمونه مرتعش اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد در حالی که در تیمار شاهد هیچ سیگنال مغناطیسی در اندام‌های مختلف سویا مشاهده نگردید، وجود سیگنال مغناطیسی قوی در برگ سویای کشت شده در محلول حاوی نانوذرات مگنتیت، نشانه‌ی جذب و انتقال نانوذرات از طریق ریشه و آوند چوبی به برگ بوده است. قویترین سیگنال مغناطیسی (۱۳۸ memu/g) در ریشه دیده شد و ضریب انتقال نانوذرات از ریشه به برگ در حدود ۰/۹ درصد بوده است. ترشحات و بار سطحی ریشه موجب تجمع نانوذرات در سطح ریشه سویا گشته و بخش اندکی از ذرات از طریق مسیرهای سیمپلاستی وارد آوند چوبی شده و سپس توسط جریان شیره آوندی به برگ منتقل شده است. در ناحیه طوقه، به علت تبدیل ساختار آوندی ریشه به ساقه، تجمع زیادی نسبت به سایر اندام‌های هوایی صورت پذیرفته است. به طور کلی، نانوذرات مگنتیت می‌توانند به صورت مولکولی توسط سویا از محلول غذایی جذب شده و به سایر اندام‌های گیاه منتقل شوند.

واژه‌های کلیدی: نانوفناوری، مغناطیس‌سنج نمونه مرتعش، کلات آهن

مقدمه

نانوفناوری عبارت است از دستکاری دقیق و کنترل شده ساختار اتمی یا مولکولی مواد در مقیاس نانومتر به منظور تهیه ریزذراتی با خصوصیات نوظهور و کاربردهای خاص (۲۵). نانوذرات سنتزی به‌علت داشتن اندازه کوچک، نسبت سطح به حجم بزرگ و انرژی سطحی فراوان، دارای خصوصیات متفاوتی از مواد توده‌ای هم‌ساختار و اتم‌های تشکیل دهنده خود هستند. این ویژگی‌های نانومواد، سبب کاربرد موفق در صنایع مختلف و ایجاد تمایل زیاد برای استفاده در کشاورزی شده است (۴).

با توجه به اینکه گیاهان از طریق آب، خاک و هوا در معرض نانومواد قرار دارند، بررسی تأثیر نانومواد بر گیاهان به عنوان یکی از مهمترین اجزای اکوسیستم و اصلی‌ترین راه ورود به زنجیره غذایی، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

تاکنون تحقیقات اندکی درباره اثرهای مثبت و منفی، مکانیسم‌های جذب و انتقال در درون گیاه و کاربردهای بیوتکنولوژیک نانوذرات انجام گرفته است. بیشترین تحقیقات

۱ گروه خاک‌شناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس

۲. بخش نانوتکنولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه تهران

*: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: hghafarm@modares.ac.ir

صورت گرفته مربوط به بررسی اثر سمیت ناشی از نانوذرات بر شاخص جوانه‌زنی بذر و طول ریشه‌چه است (۱۲ و ۱۴).

نوع و میزان تأثیر نانوذرات بر جوانه‌زنی گیاهان وابسته به گونه گیاهی، غلظت نانوذرات در محیط، زمان تماس، ویژگی‌های ذاتی نانو مواد و اثر متقابل محیط زنده و گیاه بر همدیگر می‌باشد. این وابستگی‌ها و سایر عوامل ناشناخته موجب تناقض در نتایج حاصله شده است (۱۶، ۱۹، ۲۱، ۲۳، ۲۷، ۲۹ و ۳۱). مطالعات زیادی درباره مکانیسم جذب و تأثیر محیط بیولوژیک بر نانوذرات در سلول‌های جانوری صورت گرفته است (۱). تحقیقات درباره میزان و مکانیسم جذب و انتقال نانومواد در گیاهان در ابتدای راه است و می‌توان آنها را به دو دسته سلولی و درون بافتی تقسیم نمود. از آنجا که در ارزیابی مکانیسم جذب سلولی دیواره سلولی گیاه، یکی از اصلی‌ترین تفاوت‌های ساختار گیاهی با جانوری حذف گردیده است، لذا نتایج این تحقیقات باید با انجام پژوهش‌های تکمیلی پیرامون اثر دیواره سلولی بر جذب انتخابی ذرات تکمیل گردد (۳ و ۶). بررسی مکانیسم جذب و انتقال درون بافتی نانوذرات در گیاهان به دو شکل ارزیابی مستقیم و غیر مستقیم صورت می‌پذیرد. در ارزیابی مستقیم با بهره‌گیری از روش‌های میکروسکوپی (نوری، فلورسنت، الکترونی روبشی و کونفوکال) نانوذرات را در بافت‌های مختلف گیاهی شناسایی می‌کنند (۲، ۵ و ۹). در ارزیابی غیرمستقیم جذب و انتقال نانوذرات از خصوصیات آنها همچون خواص مغناطیس، فلورسنت و غیره بهره می‌گیرند (۸، ۳۰ و ۳۲).

نانوذرات مگنتیت فاقد عوارض سمی برای گیاه در غلظت‌های اندک بوده و با به‌کارگیری در رهایش هدفمند دارو، تصویربرداری مغناطیسی هسته و گرما درمانی یکی از پرکاربردترین نانوذرات به‌شمار می‌روند (۱۷ و ۱۸). شناسایی و سنجش قدرت سیگنال‌های مغناطیسی در بافت‌های مختلف گیاهی با دستگاه مغناطیس‌سنجش مرتعش (Vibrating sample magnetometer, VSM) یکی از روش‌های غیر مستقیم برای ارزیابی جذب و انتقال نانوذرات است. اولین تحقیق با این روش توسط ژو و همکاران (۳۲) انجام شد. نتایج این تحقیق نشان داد که نانوذرات مگنتیت دارای میانگین ابعادی ۲۰ نانومتر توانستند از محلول حاوی ۰/۵ گرم در لیتر در کشت هیدروپونیک جذب گیاه کدو تنبل (*Cucurbita mixta*) شده و سیگنال مغناطیسی از بافت‌های مختلف مشاهده گردید؛ در حالی که هیچ سیگنالی از لوبیا سبز (*Phaseolus limensis*) کشت شده در همین محلول دیده نشد. همچنین، هیچ سیگنالی در گیاهان کشت شده در بستر شنی و تغذیه شده با محلول مشابه دیده نشد. نتایج تحقیق ونگ و همکاران (۳۰) نشان داد که نانوذرات مگنتیت دارای میانگین ابعاد ۲۵ نانومتر و بدون اصلاح ساختار سطحی در محلول غذایی حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به شدت کلوخه شده و نتوانستند جذب کدو تنبل و چچم (*Lolium perenne* L.) شوند.

جذب و انتقال نانوذرات در گیاهان بستگی به گونه گیاهی، ویژگی‌های ذاتی نانومواد و اثر متقابل محیط زنده و گیاه داشته و سایر عوامل ناشناخته موجب تناقض در نتایج به‌دست آمده شده است (۱۹، ۲۰، ۲۲، ۲۴، ۲۸، ۳۰ و ۳۲). بر این اساس، در تحقیق حاضر، از خصوصیات مغناطیسی نانوذرات مگنتیت سنتز شده به روش هیدروترمال با پایداری حداقل شش ماه استفاده شد. برای جلوگیری از اثرهای پیچیده خاک بر جذب نانوذرات مگنتیت در این آزمایش، از محیط کشت هیدروپونیک استفاده شد. گیاه سویا به دلیل حساس بودن به کمبود آهن، توانایی جذب آب زیاد و مهم بودن از لحاظ اقتصادی، برای ارزیابی جذب و انتقال نانوذرات مگنتیت انتخاب شد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در شرایط کنترل شده، با میانگین دمای روز ۲۷ و دمای شب ۱۸ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۶۰٪ در گلخانه دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، انجام شد. بذرهای سویا با محلول هیپوکلریت ۲/۵٪ به مدت ۳ دقیقه ضدعفونی و سه بار با آب مقطر شسته شدند. سپس بذرها در درون ظرف‌های حاوی پرلایت جوانه زده و تا مرحله ۴ برگی در آنها نگهداری شدند. دانهال‌های ۴ برگی به ظرف‌های ۲ لیتری حاوی محلول غذایی، دارای سیستم هوادهی با توان mLair/min ۴۰۰ منتقل شدند. ترکیب محلول غذایی با غلظت‌هایی (بر حسب میلی‌گرم

در لیتر) به شرح زیر بوده است: KH_2PO_4= ۶۸، KNO_3= ۵۰۵، $K_2HPO_4.3H_2O$ = ۱۱۴، $MgSO_4$ =۲۴۰، $Ca(NO_3)_2$ = ۱۰۲، H_3BO_3 = ۲/۸۶، $MnSO_4.H_2O$ = ۰/۳۱، $ZnSO_4.7H_2O$ = ۰/۲۲ و $CaCl_2$ = ۰/۷۱، $CuSO_4.5H_2O$=۲/۲۹، $NaMoO_4.2H_2O$ = ۰/۰۲۳. پ- هاش محلول با اسید سولفوریک و یا سود در محدوده ۶±۰/۲ تنظیم و کنترل شد. محلول شاهد حاوی ۳۳ میلی‌گرم در لیتر کلات آهن (Fe-EDTA) و محلول نانوذرات مگنتیت حاوی ۶۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذره دارای سه تکرار بودند. غلظت نانوذرات مگنتیت در محلول غذایی بر اساس میزان آهن مورد نیاز سویا و ضریب حلالیت مگنتیت توسط نرم‌افزار hydrobuddy v1.5 محاسبه و به‌کار گرفته شد. غلظت نانوذرات در این آزمایش تقریباً ۰/۱ غلظت به‌کار گرفته شده در آزمایش ژو و همکاران (۳۲) در کدو بود. براساس نیاز آبی گیاهان، سطح محلول در حد ۲ لیتر نگهداری و به صورت هفتگی تعویض گردید. نانوذرات مگنتیت به‌کار گرفته شده در این آزمایش، در بانک سلولی انستیتو پاستور به روش هیدروترمال سنتز و با پلیمر طبیعی دکستران پوشش داده شد. روش و ابزار اندازه‌گیری ویژگی‌های سطحی و اندازه نانوذرات در جدول ۱ آورده شده است. به منظور پراکندگی کامل نانوذرات مگنتیت، محلول حاوی نانوذرات با همزن التراسونیک (100 W, 40 kHz) به مدت نیم ساعت همزده شد.

پس از ۴ هفته، سویا برداشت و دو نمونه ۱۰ گرمی از ریشه، طوقه، ساقه و برگ تهیه و با آب شسته شدند. جهت اندازه‌گیری سیگنال‌های مغناسیسی در اندام گیاهی، یک نمونه از هر اندام در آون با دمای ۲۵۰ درجه به مدت ۴ ساعت قرار گرفت. سپس نمونه‌های گیاهی آسیاب و خاصیت مغناطیسی ایجاد شده در بافت‌های گیاه به‌وسیله دستگاه VSM مدل VSM-5-18 در دانشگاه کاشان اندازه‌گیری شد. قدرت سیگنال مغناطیسی در هر اندام گیاهی دال بر انتقال نانوذرات مگنتیت از محلول غذایی و تجمع آنها در بافت سویا است. نمونه دیگری از تمام اندام‌های گیاهی که در آن قدرت سیگنال مغناطیسی اندازه‌گیری شده بود، در خشک‌کن با دمای ۷۵ درجه سلسیوس خشک، آسیاب و به روش هضم تر (اسید سولفوریک، سالیسیلیک و آب اکسیژنه) عصاره-گیری شد. میزان آهن موجود در اندام‌های گیاهی و در محیط کشت در قبل و بعد از کشت سویا با دستگاه جذب اتمی مدل Shimadzu UV1700 UV/V اندازه‌گیری شد. سپس، براساس غلظت آهن در اندام‌های گیاهی و در محیط کشت در قبل و بعد از کشت سویا، درصد بازیافت جرمی، آهن مؤثر در محاسبات، جذب نانوذرات از محیط کشت و نسبت آهن تجمع یافته در ریشه تعیین شد. برای محاسبه ضریب انتقال آهن از ریشه به برگ، از نسبت سیگنال مغناطیسی طوقه به برگ استفاده شد، زیرا سیگنال مغناطیسی ایجاد شده در ریشه، بیشتر مرتبط با جذب سطحی نانوذرات مگنتیت در سطح بیرونی ریشه بوده و مقدار کمی از نانوذرات می‌توانند به درون بافت ریشه راه یابند. بنابراین، اندازه سیگنال مغناطیسی در طوقه گیاه که به عنوان شاخص میزان نانوذرات راه یافته به استوانه مرکزی است در نظر گرفته شد

نتایج

نتایج میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) نشان می‌دهد که نانوذرات سنتز شده در روش هیدروترمال دارای تغییرات باریک اندازه ذرات می‌باشند. نتایج روش دینامیک تفرق ذرات (DLS) و پتانسیل زتا مؤید پایداری الکتروسینتیک نانوذرات مگنتیت در محلول و جلوگیری پوشش سطح از کلوخه‌ای شدن و افزایش اندازه ذرات می‌باشد. همپوشانی نتایج روش DLS و TEM دلالت بر توزیع باریک اندازه ذرات و پایداری طولانی مدت در محلول آبی دارد. این ویژگی، آنها را مناسب کاربرد در محیط‌های زیستی و بخصوص در این آزمایش گیاهی می‌کند.

پس از ۲۸ روز، هیچ تفاوت مورفولوژیک در گیاهان سویای کشت شده در محلول دارای نانوذرات مگنتیت دیده نشد که نشانگر عدم وجود اثر سمیت نانوذرات مگنتیت با غلظت ۶۰ میلی‌گرم در لیتر باشد. به‌دلیل اینکه یون آهن فاقد خواص مغناطیسی است، بنابراین در تیمار حاوی کلات آهن، سیگنال مغناطیسی در گیاه مشاهده نشد، در حالی که در بافت‌های مختلف سویای کشت شده در محلول حاوی نانوذرات مگنتیت با مشخصات به

جدول ۱. ویژگی‌های نانوذرات مگنتیت سنتز شده به روش هیدروترمال

میانگین اندازه ذرات [c] (nm)	نوع پوشش	اندازه ذرات در محلول[b] (nm)	پتانسیل زتا[a] (mV)	مغناطیس ذرات [d] (emu/g)
۹	دکستران	۱۹/۷±۰/۴	۱۷/۷±۱/۱	۵۶/۹

a: اندازه‌گیری پتانسیل زتا به‌وسیله Malvern Zetasizer 3000 Has

b: اندازه‌گیری میانگین اندازه ذرات در محیط آبی به‌وسیله Malvern PCS-4700

c: اندازه‌گیری میانگین اندازه ذرات به‌وسیله JEOL-2010 and FEI Tecnai F20 electron microscopes operating at 200 kV

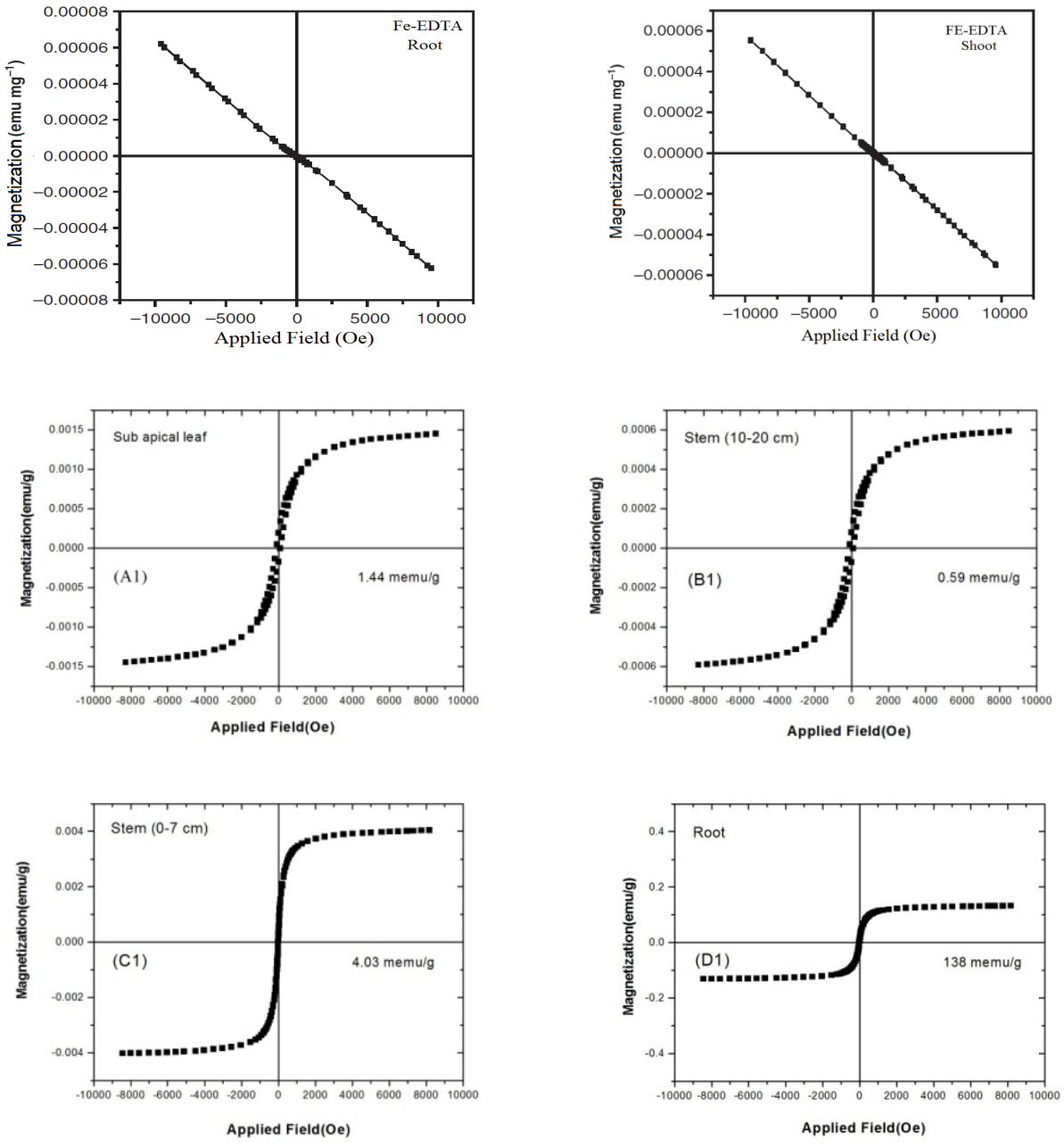
d: اندازه‌گیری خاصیت مغناطیسی ذرات به‌وسیله VSM-5-18

کار برده شده در این آزمایش، سیگنال‌های مغناطیسی با شدت متفاوت دیده شد (شکل ۱). سیگنال مغناطیسی با قدرت زیاد (۱/۴۴memu/g) توسط دستگاه VSM در برگ‌های کامل زیر مریستم انتهایی اندازه‌گیری شد. با توجه به اینکه هر memu/g تقریباً حاوی $۸/۴۸\times۱۰^{۱۱}$ ذره می‌باشد (با در نظر گرفتن چگالی $۵/۱۷gr/cm^3$ برای نانوذرات آهن) تخمین زده می‌شود که حداقل تعداد $۱/۲\times۱۰^{۱۰}$ نانوذره به برگ منتقل شده باشد. ریشه دارای قویترین سیگنال مغناطیسی بوده، در حالی که میزان سیگنال مغناطیسی دریافت شده از ساقه سویا ضعیف‌ترین سیگنال بود. وجود این سیگنال‌های مغناطیسی نشان می‌دهد که بخشی از نانوذرات از محلول به استوانه مرکزی راه یافته و در مسیرهای طولانی منتقل شده‌اند. سیگنال مغناطیسی اندازه‌گیری شده در ناحیه طوقه گیاه بیش از سایر مناطق ساقه بود (شکل ۱- A_1, B_1, C_1, D_1).

نتایج موازنه جرمی نشان داد که تنها ۵۸/۱ درصد از آهن موجود در محیط کشت قبل از کشت سویا، از محلول توسط بافت گیاه جذب و تجمع یافته است و ۱۹/۳ درصد از نانوذرات مگنتیت همچنان در محلول غذایی باقی مانده‌اند. حدود ۲۷/۹ درصد از نانوذرات در سطح و درون بافت ریشه قرار داشته و تنها ۰/۹ درصد به برگ‌ها منتقل شده است. این نتایج نشان داد که تنها ۷۷/۴ درصد از آهن کل در این آزمایش قابل بازیافت است. اندک بودن درصد بازیافت جرمی نانوذرات مبین از دست رفتن بخشی از نانوذرات در مراحل اندازه‌گیری و رشد گیاه است. پیش‌بینی می‌شود که بخشی از نانوذرات مگنتیت در مرحله آماده سازی نمونه از سطح ریشه و سایر اندام‌های سویا شسته شده باشد.

بحث

نتایج این تحقیق به روشنی نشان داد که نانوذرات مگنتیت سنتزی دارای میانگین قطر ۹ نانومتر می‌توانند از محلول غذایی جذب و به اندام‌های هوایی سویا منتقل شوند. اگرچه مکانیسم جذب و انتقال نانوذرات در گیاه تاکنون به دقت ارزیابی نشده است ولی براساس نتایج تحقیقات انجام گرفته می‌توان چنین فرض کرد که وجود قویترین سیگنال مغناطیسی ایجاد شده در ریشه به‌علت جذب سطحی نانوذرات به‌وسیله ترشحات و بار سطحی ریشه سویا است. تجمع در سطح ریشه موجب تغییراتی در ویژگی‌های سطحی نانوذرات و پخشیده شدن آنها به درون ریشه شده است. حفرات دیواره سلولی دارای ابعادی بین ۵ تا ۲۰ نانومتر هستند. بنابراین، از لحاظ تئوری، نانوذرات دارای ابعادی کمتر از ۲۰ نانومتر می‌توانند از دیواره سلولی عبور کنند. با این وجود، نتایج تحقیقات نشان داده که ماش و گندم قادر به جذب نانوذراتی با قطر در حدود ۵۰ نانومتر می‌باشند (۲۶). همچنین، برخی از نانوذرات مانند نقره قادرند ساختار حفرات دیواره سلولی را تغییر داده و موجب نشت پروتوپلاستی و دپلاریزه شدن غشای پلاسمایی گردند (۱۱). نانوذرات مگنتیت پس از عبور از دیواره سلولی، از غشای سلولی عبور کرده و از طریق اندوسیتوز، پروتئین‌های ناقل، یونیزاسیون سطحی توسط سلول و عبور از کانال‌های یونی، کلات کننده‌های برون سلولی و سوراخ کردن غشای سلولی به درون سلول راه یافته و از



$memu/g \times ۱۰^{۳} = emu/g$

شکل ۱. برخی سیگنال‌های مغناطیسی اندازه‌گیری شده از بخش‌های مختلف سویا

طریق مجاری سیمپلاستی به استوانه مرکزی منتقل می‌شوند (۷، ۱۰ و ۱۳). با توجه به اینکه نانوذرات مگنتیت دارای ابعاد بزرگتری نسبت به یون آهن می‌باشند، حفرات دیواره سلولی و پلاسمودسماتا موجب عبور انتخابی ذرات براساس قطر آنها می‌گردد. غشای سلولی جذب نانوذرات به درون سلول را بر اساس ویژگی‌های سطحی آنها کنترل می‌کند. پروتئین‌های غشای سلولی براساس شیمی سطح، پیوندهای کووالانتی و غیرکووالانتی با نانوذرات برقرار می‌کنند (۱۵). علاوه بر مسیرهای درون‌سلولی، مسیرهای برون‌سلولی شامل فضاهای آپوپلاستی در نواحی زیر مریستمی و نواحی اطراف ریشه‌های فرعی، مسیرهای برون‌سلولی عبور نانوذرات می‌باشند (۲۴). نانوذرات مگنتیت می‌توانند توسط جریان شیره آوندی، در اثر

تبخیر و تعرق، به اندام هوایی منتقل شوند. نتایج نشان داد که نانوذرات مگنتیت به‌کار برده شده در این آزمایش به‌دلیل داشتن ابعاد کوچکتر، ویژگی‌های سطحی مطلوب‌تر و پایداری بیشتر، توانسته‌اند نسبت به ذرات بکار برده شده در آزمایش ژو و همکاران (۳۲) کمتر در سطح ریشه تجمع یافته و بیشتر به اندام هوایی منتقل شوند.

مقدار کم درصد بازیافت جرمی نانوذرات مگنتیت ممکن است در اثر خروج آنها از طریق روزنه‌های برگ از طریق تبخیر و تعرق و یا شستشو از مقاطع گیاهی در زمان نمونه برداری باشد. در این آزمایش، امکان دارد بخشی از کاهش درصد بازیافت جرمی ناشی از یونیزه شدن نانوذرات مگنتیت در گیاه و محیط کشت و شرکت در فرایندهای بیوشیمیایی و ساختاری باشد. از آنجایی که نانوذرات مگنتیت تنها منبع آهن در محلول غذایی بوده است، عدم وجود مشاهده کلروز برگی در گیاهان کشت شده در محلول غذایی حاوی نانوذرات می‌تواند دال بر یونیزه شدن نانوذرات مگنتیت باشد.

نتیجه‌گیری

اگرچه نتایج این تحقیق به روشنی بیانگر جذب نانوذرات مگنتیت با اندازه ۹ نانومتر در شرایط هیدروپونیک است ولی قابل تعمیم به نانوذرات با مشخصات متفاوت و گونه‌های دیگر گیاهی نمی‌باشد. برای درک بهتر اثر متقابل بین گیاهان و نانوذرات، نیاز به تداوم تحقیقات در باره مکانیسم جذب و انتقال نانوذرات توسط گیاه، اثر ویژگی‌های ساختاری نانوذرات بر میزان جذب و انتقال در گیاه، میزان توانایی جذب نانوذرات در گونه‌های مختلف گیاهی و اثر ریزوسفر بر جذب نانوذرات می‌باشد

منابع مورد استفاده

1. Braydich-Stolle, L., S. Hussain, J.J. Schlager and M.C. Hofmann. 2005. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. Toxicol. Sci. 88(2): 412-419.
2. Corredor, E., P.S. Testillano, M.J. Coronado, P. Gonzalez-Melendi, R. Fernandez-Pacheco, C. Marquina, M.R. Ibarra, J.M. de la Fuente, D. Rubiales, A. Perez-de-Luque and M.C. Risueno. 2009. Nanoparticle penetration and transport in living pumpkin plants: In situ subcellular identification. BMC Plant Biol. 9: 45.
3. Dietz, K.J. and S. Herth. Plant nanotoxicology. Trends Plant Sci. 16(11): 582-589.
4. Ghormade, V., M.V. Deshpande and K.M. Paknikar. 2011. Perspectives for nano-biotechnology enabled protection and nutrition of plants. Biotechnol. Adv. 29(6): 792-803.
5. Gonzalez-Melendi, P., R. Fernandez-Pacheco, M.J. Coronado, E. Corredor, P.S. Testillano, M.C. Risueno, C. Marquina, M.R. Ibarra, D. Rubiales, D. and A. Perez-de-Luque. 2008. Nanoparticles as smart treatment-delivery systems in plants: Assessment of different techniques of microscopy for their visualization in plant tissues. Ann. Bot. 101(1): 187-195.
6. Jia, G., H. Wang, L. Yan, X. Wang, R. Pei, T. Yan, Y. Zhaoand X. Guo. 2005. Cytotoxicity of carbon nanomaterials: Single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene. Environ. Sci. Technol. 39(5): 1378-1383.
7. Kurepa, J., T. Paunesku, S. Vogt, H. Arora, B.M. Rabatic, J. Lu, M.B. Wanzer, G.E. Woloschak and J.A. Smalle. 2010. Uptake and distribution of ultrasmall anatase TiO_2 Alizarin red S nanoconjugates in Arabidopsis thaliana. Nano Lett. 10(7): 2296-2302.
8. Larue, C., M. Pinault, B. Czarny, D. Georgin, D. Jaillard, N. Bendiab, M. Mayne-L'Hermite, F. Taran, V. Dive and M. Carriere. 2012. Quantitative evaluation of multi-walled carbon nanotube uptake in wheat and rapeseed. J. Hazard. Mater. 227/228: 155-163.
9. Larue, C., J. Laurette, N. Herlin-Boime, H. Khodja, B. Fayard, A.M. Flank, F. Brisset, and M. Carriere. 2012. Accumulation, translocation and impact of TiO_2 nanoparticles in wheat (*Triticum aestivum spp.*): Influence of diameter and crystal phase. Sci. Total Environ. 431: 197-208.
10. Lee, W.M., Y.J. An, H. Yoon, H. and H.S. Kweon. 2008. Toxicity and bioavailability of copper nanoparticles to the terrestrial plants mung bean (*Phaseolus radiatus*) and wheat (*Triticum aestivum*): Plant agar test for water-insoluble nanoparticles. Environ. Toxicol. Chem. 27(9): 1915-1921.
11. Lee, W.M., J.I. Kwak and Y.J. An. 2012. Effect of silver nanoparticles in crop plants *Phaseolus radiatus* and *Sorghum bicolor*: Media effect on phytotoxicity. Chemosphere 86(5): 491-499.
12. Lin, D. and B. Xing. 2007. Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth. Environ. Pollut. 150(2): 243-250.

13. Lin, D. and B. Xing. 2008. Root uptake and phytotoxicity of ZnO nanoparticles. Environ. Sci. Technol. 42(15): 5580-5585.
14. Lu, C., C. Zhang, J. Wen, G. Wu and M. Tao. 2002. Research of the effect of nanometer materials on germination and growth enhancement of *Glycine max* and its mechanism. Soybean Sci. 21(3): 168-171.
15. Ma, X., J. Geiser-Lee, Y. Deng and A. Kolmakov. 2010. Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: Phytotoxicity, uptake and accumulation. Sci. Total Environ. 408(16): 3053-3061.
16. Ma, Y., L. Kuang, X. He, W. Bai, Y. Ding, Z. Zhang, Y. Zhao and Z. Chai. 2010. Effects of rare earth oxide nanoparticles on root elongation of plants. Chemosphere 78(3): 273-279.
17. Mahmoudi, M., A. Simchi, A.S. Milani and P. Stroeve. 2009. Cell toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. J. Colloid Interf. Sci. 336(2): 510-518.
18. Mahmoudi, M., S. Sant, B. Wang, S. Laurent and T. Sen. 2011. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy. Adv. Drug Deliver. Rev. 63(1): 24-46.
19. Miralles, P., T.L. Church and A.T. Harris. 2012. Toxicity, uptake, and translocation of engineered nanomaterials in vascular plants. Environ. Sci. Technol. 46(17): 9224-9239.
20. Monica, R.C. and R. Cremonini. 2009. Nanoparticles and higher plants. Caryol. 62(2): 161-165.
21. Murashov, V., D.J. Watts and L. Yang. 2006. Comments on: Particle surface characteristics may play an important role in phytotoxicity of alumina nanoparticles. By Yang, L. and D.J. Watts, Toxicology Letters, 2005, 158: 122-132. Authors' reply. Toxicol. Lett. 164(2): 185-188.
22. Nair, R., S.H. Varghese, B.G. Nair, T. Maekawa, Y. Yoshida and D.S. Kumar. 2010. Nanoparticulate material delivery to plants. Plant Sci. 179(3): 154-163.
23. Nel, A., T. Xia, L. Mädler and N. Li. 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. Sci. 311(5761): 622-627.
24. Nowack, B. and T.D. Bucheli. 2007. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. Environ. Pollut. 150(1): 5-22.
25. Roco, M.C. 2003. Broader societal issues of nanotechnology. J. Nanopart. Res. 5(3-4): 181-189.
26. Rondeau-Mouro, C., D. Defer, E. Leboeuf and M. Lahaye. 2008. Assessment of cell wall porosity in *Arabidopsis thaliana* by NMR spectroscopy. Int. J. Biol. Macromol. 42(2): 83-92.
27. Ruffini Castiglione, M., L. Giorgetti, C. Geri and R. Cremonini. 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. J. Nanopart. Res. 13(6): 2443-2449.
28. Schwabe, F., R. Schulin, L.K. Limbach, W. Stark, D. Bürge and B. Nowack. 2013. Influence of two types of organic matter on interaction of CeO_2 nanoparticles with plants in hydroponic culture. Chemosphere 91(4): 512-520.
29. Stampoulis, D., S.K. Sinha and J.C. White. 2009. Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants. Environ. Sci. Technol. 43(24): 9473-9479.
30. Wang, H., X. Kou, Z. Pei, J.Q. Xiao, X. Shan and B. Xing. 2011. Physiological effects of magnetite (Fe_3O_4) nanoparticles on perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and pumpkin (*Cucurbita mixta*) plants. Nanotoxicol. 5(1): 30-42.
31. Yang, L. and D.J. Watts. 2005. Particle surface characteristics may play an important role in phytotoxicity of alumina nanoparticles. Toxicol. Lett. 158(2): 122-132.
32. Zhu ,H., J. Han, J.Q. Xiao and Y. Jin. 2008. Uptake, translocation, and accumulation of manufactured iron oxide nanoparticles by pumpkin plants. J. Environ. Monit. 10(6): 713-717