

تأثیر کاربرد نانوللهای کربنی بر باززایی گیاه رزماری در شرایط درون

شیشه‌ای^۱

Investigation on the Effects of Carbon Nanotubes application on Regeneration of the Rosemary Plants under *In vitro* Conditions

یونس پوربیرامی هیر^{*}، مهدی خسروی مجدر، موسی ترابی گیگلو، اسماعیل چمنی، حسن ملکی لجاير و مهسا احذزاده^۲

چکیده

به دلیل توانایی نانوللهای کربن در جهت افزایش کارآئی فتوسنتز در گیاهان از طریق اتصال به کلروپلاست هدف از این مطالعه ارزیابی میزان تأثیر نانوللهای کربن تک جداره بر خصوصیات مورفولوژیک و فیزیولوژیک گیاه رزماری بود. این آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی با نانوللهای کربنی در ۱۰ سطح و ۵ تکرار انجام گرفت. تأثیر نانوللهای کربن بر صفات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاه رزماری معنی دار بود. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین ارتفاع گیاه در غلظت ۹۰ میلی‌گرم بر لیتر و کمترین در شاهد مشاهده شد. کمترین درصد باززایی در تیمار شاهد مشاهده شد. بیشترین و کمترین تعداد برگ به ترتیب از غلظت‌های ۹۰ میلی‌گرم بر لیتر و تیمار شاهد به دست آمد. بیشترین سطح برگ و وزن تر مر بوط به تیمار ۹۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوللهای کربن بود. مقایسه میانگین شاخص‌های فیزیولوژیکی نشان داد بیشترین میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کاروتونئید و فنول کل در غلظت ۹۰ میلی‌گرم بر لیتر نانولله کربن و کمترین میزان فنول کل در شاهد مشاهده گردید. بیشترین میزان کلروفیل کل در تیمار ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوللهای کربن و کمترین میزان این شاخص در تیمار شاهد بود. انتظار می‌رود، از این روش برای باززایی و استفاده از متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دیگر استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: رزماری، کشت بافت، نانوللهای کربن، رنگدانه‌های فتوسنتزی.

مقدمه

گیاهان دارویی و معطر از هزاران سال پیش تا زمان حاضر توسط بشر مورد استفاده قرار گرفته و در زندگی آن نقش بسیار مهمی داشته است. این اهمیت به دلیل خاصیت شفابخش این گیاهان بوده که با متابولیت‌های ثانویه موجود در آن‌ها مرتبط است. امروزه تقریباً نیمی از داروهای مورد استفاده توسط انسان به طور مستقیم یا غیرمستقیم از گیاهان دارویی حاصل می‌شوند (۱). گیاهان می‌توانند به عنوان منابع درمانی به شکل تزریق گیاهی، فرآورده‌های دارویی مانند عصاره‌ها، قرص‌ها یا کپسول‌ها از طریق استخراج و خالص سازی ترکیبات فعال مورد استفاده قرار گیرند. در قسمت‌های مختلف اندمهای گیاهان برخی از مواد تولید و ذخیره می‌شوند و اغلب دارای اثرات درمانی هستند و به عنوان عوامل دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۲۰). علی‌رغم اهمیت گیاهان دارویی در زندگی انسان، مشکلاتی از قبیل خطر انفراض برخی گونه‌ها به دلیل برداشت بی‌رویه از طبیعت، نوسان در میزان متابولیت‌های ثانویه به دلیل نوسانات اقلیمی و نیاز به شرایط محیطی خاص محیطی، عملکرد پایین (کمتر از یک درصد وزن خشک گیاه)، تولید برخی متابولیت‌های ثانویه در اندامها یا مراحل رشدی خاص در گیاه و همچنین روش‌های خاص تکثیر و خواب بذر در گیاهان دارویی سبب شده تا کشت بافت گیاهی به عنوان روشی کارآمد و مؤثر در زمینه تولید و تکثیر گیاهان دارویی و راهکاری برای غلبه بر مشکلات تولید سنتی آن‌ها مورد استفاده قرار گیرد (۲۵، ۲۵).

۱- تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۵/۱۹

۲- به ترتیب استادیار، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیار، استاد، استادیار دانشگاه حقوق اردبیلی و دانشجوی کارشناسی ارشد، اردبیل، ایران.

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: Younes_ph62@uma.ac.ir

رزماری^۱ یک گیاه چندساله همیشه سبز بومی مناطق مدیترانه و متعلق به تیره نعناسانان است که به دلیل متابولیت‌های ثانویه و مواد معطر ارزشمند موجود در آن کاربرد وسیعی در صنایع دارویی، غذایی و آرایشی و بهداشتی داشته و در سراسر جهان کشت می‌شود (۷). مهم‌ترین متابولیت‌های ثانویه این گیاه ترکیبات فنولی شامل رزمارینیک اسید، کارنوسیک اسید، کافئیک اسید و هسپریدین^۲ و همچنین ترکیبات غالب اسانس آن شامل سینئول^۳، آلفا پین^۴، کامفن^۵، لیمونن^۶ و بورنئول^۷ است (۸). این ترکیبات فیتوشیمیایی سبب شده تا اسانس و عصاره رزماری دارای خواص دارویی متعددی از جمله خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی، ضدالتهاپی، ضد گرفتگی عضلانی، ضد تشنج، ضد دیابت، محافظت کننده کبد و محافظت کننده سیستم عصبی بوده و در درمان بیماری‌های مختلف به کار گرفته شوند (۹، ۱۰). در سال‌های اخیر نانو فناوری به یکی از مهم‌ترین و مهیج‌ترین زمینه‌های پیش رو در علوم مختلف مانند فیزیک، شیمی و زیست‌شناسی تبدیل شده است و نوبدیخش آن است که در آینده‌ای نزدیک، موقوفیت‌های زیادی پیش روی ما قرار خواهد داد، به طوریکه جهت‌گیری پیشرفت‌های فنی را تغییر خواهد داد (۲۵). از این رو توجه به کاربرد نانو ذرات در کشاورزی و تأثیر آن‌ها بر رشد و نمو یاخته‌ها و بافت‌های گیاهی نیز جلب شده و مطالعاتی در این زمینه صورت پذیرفته است. نانولوله‌های کربنی، درشت مولکول‌های کربنی استوانه‌ای شکل با شعاع کمتر از چند نانومتر هستند که طول آن‌ها تا ۲۰ سانتی‌متر نیز می‌رسد. مطالعات صورت گرفته در دهه اخیر ثابت کرده است که نانولوله‌های کربنی عملکردی شبیه به تنظیم‌کننده‌های رشد در گیاهان داشته و فرایندهای مختلفی از جمله بیان ژن (۱۱)، مقاومت به تنش (۱۲)، جذب عناصر غذایی (۲۴)، جوانه‌زنی بذر و رشد و نمو (۲۱) در گیاهان مختلف را تحت تأثیر قرار می‌دهند. همچنین گزارش‌هایی نیز از کاربرد نانولوله‌های کربنی بر رشد درون شیشه‌ای برخی گیاهان منتشر شده است (۱۶، ۳). در پژوهشی Khodakovskaya و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که کاربرد نانولوله‌های کربنی چند جداره در غلظت‌های ۵ تا ۰۰۵ میلی‌گرم بر لیتر سبب افزایش ۵۵–۶۴ درصدی رشد پینه تباکو از طریق افزایش بیان ژن‌های دخیل در تقسیم یاخته‌ای و تشکیل دیواره یاخته‌ای شده است. در مطالعه دیگری، Khodakovskaya و همکاران (۲۰۱۳) افزایش چهار برابری در وزن تر گیاه‌چههای گوجه‌فرنگی کشت شده در محیط کشت MS حاوی نانولوله‌های کربنی چند جداره پس از چهار هفت‌هفته را گزارش کردند. Heydari (۲۰۱۳) گزارش کرد که کاربرد نانولوله‌های کربنی چند جداره سبب افزایش درصد پینه‌زایی، رشد پینه، القاء اندام‌های شبه پدازه^۸ و همچنین سرعت و میزان پرآوری گیاه‌چهه و شاخص‌های رشدی آن در گیاه آنتوریوم در شرایط درون شیشه‌ای شده است. در پژوهش دیگری روی مرزه خوزستانی مشخص شد که غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانولوله‌های کربنی چند جداره سبب افزایش معنی‌دار درصد پینه‌زایی، وزن تر و خشک پینه و همچنین تولید رزمارینیک اسید در پینه‌های گیاه شده است (۱۹). همچنین گزارش شده است که نانولوله‌های کربنی چند جداره بر تمامی مراحل القاء رویان زایی سوماتیکی در خرما تأثیر مثبت داشته و همچنین سبب افزایش درصد جوانه‌زنی رویان، تعداد برگ و طول ریشه گیاه‌چههای حاصل شده است (۱۵). در پژوهش دیگری مشخص شد که غلظت‌های ۲۵ تا ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانولوله‌های کربنی چند جداره سبب افزایش معنی‌دار وزن تر کشت‌های سوسپانسیون مریم گلی و همچنین میزان تولید رزمارینیک اسید، سالوبانولیک اسید، فرولیک اسید و سینامیک اسید در آن شده است (۴). از این رو با توجه به اهمیت دارویی گیاه رزماری و مشکلات موجود در زمینه تکثیر این گیاه و همچنین نتایج مثبت گزارش شده در مورد تأثیر نانولوله‌های کربنی بر رشد درون شیشه‌ای برخی گیاهان و عدم مطالعه کافی در زمینه تأثیر نانولوله‌های کربنی تک جداره، پژوهش حاضر با هدف تأثیر نانولوله‌های کربنی تک جداره بر باززایی و ویژگی‌های بیوشیمیایی گیاه رزماری در شرایط درون شیشه‌ای انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه ریزنمونه و ضدغ Fonni

پژوهش حاضر در سال ۱۳۹۸ در دانشکده کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی صورت پذیرفت. برای این منظور از ساقه‌های تازه رشد کرده گیاه رزماری موجود در گلخانه دانشگاه محقق اردبیلی برای ریز ازدیادی استفاده شد. به منظور ضدغ Fonni ریزنمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در آب حاوی مایع ظرف‌شویی غوطه‌ور گردیده و سپس به مدت ۲۰ دقیقه زیر آب جاری شهری

Limonene -۶	Camphene -۵	α -Pinene -۴	1,8-cineole -۳	Hesperidin -۲	<i>Rosmarinus officinalis</i> L. -۱
			Protocorm-like Bodies	-۸	Borneol -۷

شسته شدند تا ۵۰ درصد و غبار و مایع ظرفشویی از سطح آنها شسته شود. برای تعیین بهترین روش ضدغونی ریزنمونه‌ها از تیمارهای الكل ۷۰ درصد به مدت ۳۰، ۴۵ و ۶۰ ثانیه و هیپوکلریت سدیم با غلظت‌های مختلف ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ درصد و زمان‌های مختلف ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ دقیقه استفاده شد. پس از انجام مراحل ضدغونی، تمامی ریزنمونه‌ها به مدت ۲، ۵ و ۱۰ دقیقه با آب قطره دوبار تقطیر سترون آبکشی شدند. ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS حاوی ۳۰ گرم ساکارز و ۸ گرم آگار کشت شدند. کلیه مواد و ظروف و محیط‌های کشت در دمای ۱۲۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو گردید. کشت‌ها در دمای ۲۰ درجه سلسیوس و در ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفت. پس از گذشت یک ماه نتایج کشت‌ها بررسی شد. نتایج نشان داد که کشت‌های مربوط به تیمار الكل ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه و هیپوکلریت سدیم ۲ درصد و مدت زمان ۵ دقیقه فاقد آلودگی بود. بنابراین از تیمار مربوطه جهت ضدغونی ریزنمونه‌ها در مراحل بعدی استفاده شد.

آماده‌سازی محیط کشت

به منظور انجام پژوهش حاضر، نانولوله‌های کربنی تک جداره از شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان خریداری شد که ویژگی‌های آن در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱- ویژگی‌های نانولوله کربن تک جداره.

Table 1. Single-walled Carbon nanotube characters.

Description	توضیحات	ویژگی properties
< ۹۶ درصد وزنی (< ۹۶%)	خلوص	Purity
۲-۱ نانومتر (1-2 nm)	قطر خارجی	External diameter
(0.8-1.6 nm) - ۰/۸ نانومتر (0.8-1.6 nm)	قطر داخلی	Internal diameter
۱/۱ نانومتر (1.1 nm)	قطر متوسط	Average diameter
۱۵-۵۰ μm (TEM) (15-50 μm)	طول	Length
< ۵۸۰ μm (BET) (580 μm <)	مساحت سطح ویژه	Special surface area
۰/۱۴ g/cm ^۳ (0.14 g/cm ³)	چگالی بالک (توده‌ای)	Bulk density (Mass)
۰/۲۱ g/cm ³ (2.1 g/cm ³)	چگالی حقیقی (ذره‌ای)	Actual density (Particle)
۱۰۰ S/cm (100 S/cm)	هدایت الکتریکی	Electrical conductivity
۵۰-۲۰۰ V/m ^۳ (50-200 V/m ³)	هدایت حرارتی	Thermal conductivity
مشکی (Black)	رنگ	Color
۶۱۰ درجه سلسیوس (610 °C)	دمای اشتعال	Ignition temperature
انباشت بخار شیمیایی (Accumulation of chemical vapors)	روش ساخت	Construction method

برای آماده‌سازی نانولوله‌های کربنی برای استفاده در محیط کشت از روش Heydari و همکاران (۱۲) استفاده شد. بدین منظور محلول ذخیره ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانولوله‌های کربنی از طریق اضافه نمودن ۲۰ میلی‌گرم پودر نانولوله‌های کربنی تک جداره به ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر تهیه شد. سپس به منظور همگن‌سازی و پراکنش یکنواخت نانولوله‌های کربنی در آب، مخلوط فوق به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه التراسونیک (مدل UP400st) با توان ۴۰۰ وات قرار گرفت. سپس غلظت‌های

مورد نظر شامل غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰ و ۹۰ میلی‌گرم بر لیتر از محلول ذخیره نanolوله‌های کربنی تهیه شده و به محیط کشت MS حاوی ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز اضافه شدند. سپس pH محیط‌های کشت با استفاده از NaOH و HCl یک نرمال روی ۵/۸ تنظیم شده و به آن‌ها مقدار ۸ گرم بر لیتر آگار اضافه شده و مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و قرار داده شدند. از محیط کشت MS فاقد ذخیره نanolوله‌های کربنی به عنوان شاهد استفاده شد. سپس ریزنمونه‌های استقرار یافته رزماری به محیط کشت‌های مذکور منتقل و به مدت هشت هفته در هفته در اتاقک رشد با دمای $1\pm24^{\circ}\text{C}$ و شدت نور $35 \mu\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ حاصل از لامپ‌های فلورستن سفید و چرخه ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند.



Fig. 1. Rosemary plantlet derived from shoot tip culture in MS medium.

شکل ۱- گیاهچه‌های رزماری حاصل از کشت سرشاره در محیط MS



Fig. 2. The effects of different treatments of Carbone nanotubes on growth of Rosemary plants. (Concentration of the treatments from left to right, Control, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 and 90 (mg L^{-1}) Carbone nanotubes).

شکل ۲ - تأثیر تیمارهای مختلف نانولله‌های کربن بر رشد گیاه رزماری. (غلظت تیمارها از چپ به راست شاهد، ۱۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰ و ۹۰ نانولله‌های کربن (میلی گرم بر لیتر).

اندازه‌گیری تعداد برگ، ارتفاع گیاه، درصد باززایی، سطح برگ و وزن ترا

بعد از گذشت دو ماه تعداد برگ و ارتفاع گیاه پس از خارج کردن گیاهچه‌ها و تمیز کردن ژل اطراف آنها شمارش گردید. برای اندازه‌گیری درصد باززایی که در داخل هر شیشه چهار عدد نمونه کشت شده بود و بر اساس سالم بودن و رشد نمونه شمارش گردید و درصد آن محاسبه شد. وزن ترا گیاه با ترازوی دیجیتال با دقت ده هزارم گرم تعیین گردید.

اندازه‌گیری رنگدانه‌های فتوسننتزی

برای سنجش غلظت کلروفیل $2/0.0$ گرم نمونه‌ی برگی تازه در استون ۸۰ درصد عصاره‌گیری شد (۱۳). سپس عصاره حاصل از کاغذ صافی عبور داده شد و تا رسیدن به حجم ۲۵ میلی‌لیتر و استخراج کامل کلروفیل به آن استون اضافه شد. جذب نوری کلروفیل a و b به ترتیب در طول موج‌های ۶۴۵ و ۶۶۲ نانومتر خوانده شد و با استفاده از فرمول مربوطه غلظت کلروفیل a و کلروفیل کل بر حسب میلی‌گرم برگ تازه به دست آمد.

غلظت کلروفیل‌های a و b از فرمول‌های زیر به دست می‌آید (۱۴):

$$a = \text{کلروفیل } (19.3 * A663 - 0.86 * A645) V/100W$$

$$b = \text{کلروفیل } (19.3 * A645 - 3.6 * A663) V/100W$$

$$\text{کلروفیل کل } = a+b$$

$$\text{کاروتینوئید } = 100(A470) - 3.27(\text{mg chl. a}) - 10.4(\text{mg chl. b})/227$$

$$W: \text{وزن ترا برگ (گرم)} \quad V: \text{حجم استون (میلی‌لیتر)} \quad D: \text{طول موج (نانومتر)}$$

اندازه‌گیری محتوای فنول کل

محتوای فنول کل بر اساس روش اسلینکردن و سینگلتون اندازه‌گیری شد (۲۱). ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره گیاهی سانتریفیوژ شده با ۱/۵ میلی‌لیتر سیوکالتیو^۱ محلول بعد از گذشت ۵ دقیقه، محلول ۱/۴ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷٪ به آن اضافه و پس از گذشت مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر با استفاده از اسپکتروفوتومتر (مدل Jenway) خوانده شد. نمونه شاهد نیز با جایگزین کردن ۰/۰ میلی‌لیتر آب مقطر به جای عصاره گیاهی تهیه گردید.

سنجهش فلاونوئید کل

برای اندازه‌گیری فلاونوئیدها از روش Krizek و همکاران (۱۷) استفاده شد. ۰.۰۵ گرم از نمونه گیاهی درون هاون قرار داده و سپس ۳ میلی‌لیتر اتانول اسیدی (اتانول و اسید استیک به نسبت ۹۹ به ۱) اضافه کرده پس از ساییدن و تهییه محلول یکنواخت، به مدت ۱۵ دقیقه و ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (مدل ۱۵K SIGMA) شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری (مدل SD16) با دمای ۸۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. میزان جذب نمونه‌ها پس از سرد شدن توسط اسپکتروفتومتر (مدل Jenwey) در سه طول موج ۳۷۰، ۳۰۰ و ۳۳۰ نانومتر قرائت گردید. برای محاسبه غلظت فلاونوئیدها در هر سه طول موج به صورت جداگانه از فرمول ضریب خاموشی استفاده شد.

$$A = \epsilon b c$$

که در آن A میزان جذب قرائت شده در طول موج تعیین شده، ϵ ضریب خاموشی ۳۳ بر میلی‌مولار بر سانتی‌متر، c غلظت فلاونوئید (بر حسب مولار) و b عرض کووت (۱سانتی‌متر) می‌باشد.

وآکاوی آماری

پژوهش حاضر در قالب طرح به‌طور کامل تصادفی و با پنج تکرار انجام پذیرفت. تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام پذیرفت. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک درصد انجام شد. به منظور رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

نتایج

درصد باززایی گیاه رزماری

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان می‌دهد که تأثیر غلظت‌های مختلف نانولوله‌های کربن تک جداره بر شاخص درصد باززایی گیاهچه‌های رزماری در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بوده است. مقایسه میانگین داده‌ها (شکل ۳) نشان می‌دهد که با افزایش غلظت نانولوله‌های کربن تک جداره از ۱۰ تا ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر در محیط کشت، میزان باززایی به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است، اما در غلظت‌های ۳۰ تا ۹۰ میلی‌گرم بر لیتر نانولوله‌های کربن تک جداره تفاوت معنی‌داری از نظر آماری بین تیمارها مشاهده نشد، هر چند نسبت به شاهد و غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر به طور معنی‌داری بیشتر بود.

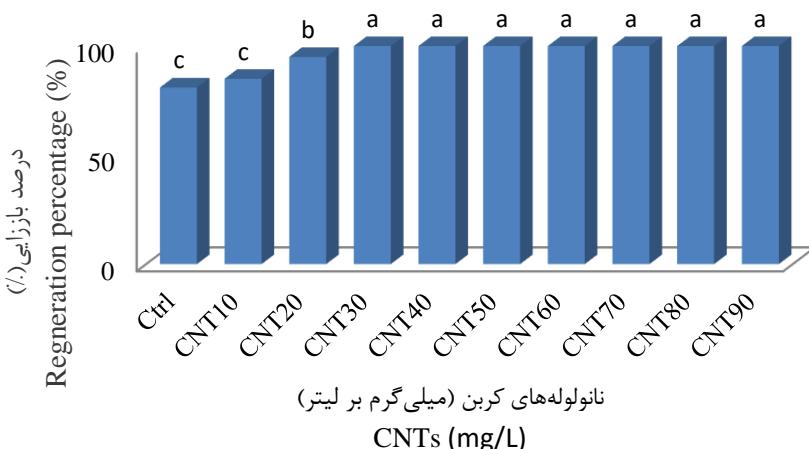


Fig. 3. The effects of different CNTs concentration on regeneration percentage of the Rosemary plants.

شکل ۳- تأثیر غلظت‌های مختلف نانولوله کربن بر درصد باززایی گیاهچه‌های رزماری.

تعداد برگ

تأثیر غلظت‌های مختلف نانولوله‌های کربن تک جداره بر شاخص تعداد برگ گیاهچه‌های رزماری در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بوده است. بر اساس نتایج به دست آمده از مقایسه میانگین داده‌ها (شکل ۴)، با افزایش غلظت نانولوله‌های کربن تک جداره در محیط کشت از ۱۰ تا ۹۰ میلی‌گرم بر لیتر، تعداد برگ در گیاهچه‌های باززایی شده به طور پیوسته افزایش

می‌باید به طوری که بیشترین تعداد برگ (۹ عدد) در تیمارهای ۹۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها و شاهد از خود نشان داد.

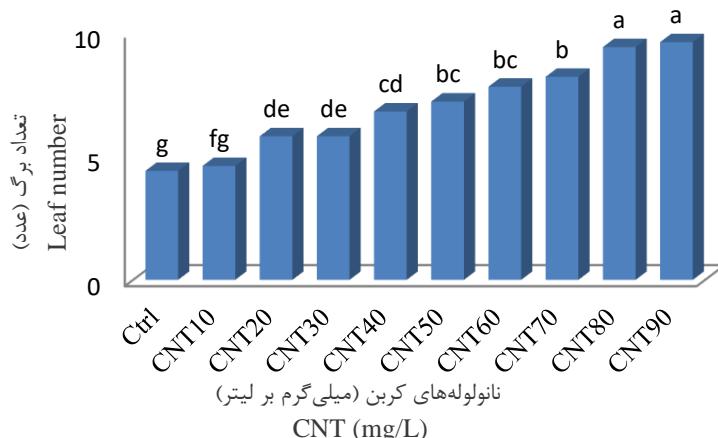


Fig. 4. The effects of different CNTs concentration on leaves number of the Rosemary plants.

شکل ۴- تأثیر غلظت‌های مختلف نانولوله کربن بر تعداد برگ گیاه‌چه‌های رزماری.

ارتفاع گیاه

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تأثیر غلظت نانولوله‌های کربن بر میزان ارتفاع گیاه رزماری در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. بر اساس مقایسه میانگین داده‌ها، تیمار نانولوله‌های کربن بر شاخص ارتفاع گیاه رزماری تأثیر داشت، به طوری که باعث افزایش ارتفاع رزماری نسبت به شاهد گردید و بیشترین ارتفاع (۴/۴ سانتی‌متر) در غلظت ۸۰ و ۹۰ میلی‌گرم بر لیتر و کمترین ارتفاع (۲/۹۵ سانتی‌متر) در شاهد مشاهده شد (شکل ۵).

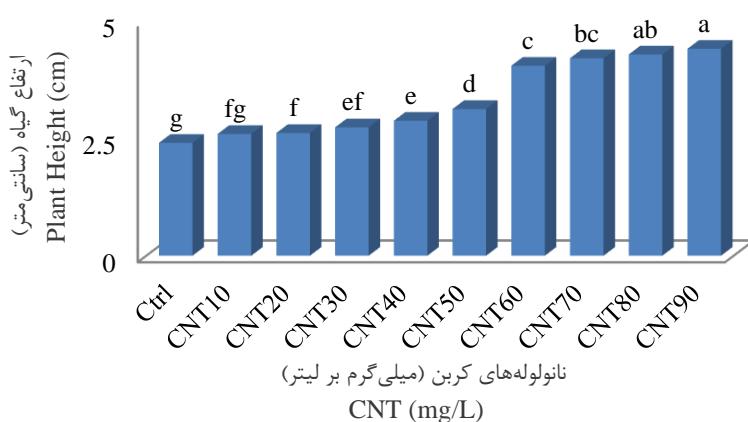


Fig. 5. The effects of different CNTs concentration on plantlet height of the Rosemary plants.

شکل ۵- تأثیر غلظت‌های مختلف نانولوله کربن بر ارتفاع گیاه‌چه‌های رزماری.

سطح برگ

نتایج حاصل از تجزیه واریانس تأثیر غلظت نانولوله‌های کربن بر شاخص سطح برگ در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. مقایسه میانگین تأثیر نانولوله‌های کربن بر شاخص سطح برگ نشان داد بیشترین سطح برگ (۰/۴۳ سانتی‌مترمربع) مربوط به تیمار ۹۰ میلی‌گرم بر لیتر نانولوله‌های کربن و کمترین (۰/۱۶ سانتی‌مترمربع) در تیمار شاهد به دست آمد که اختلاف معنی‌دار داشتند (شکل ۶).

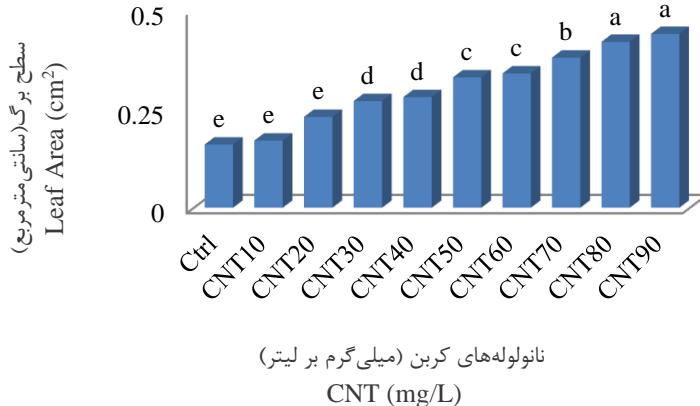


Fig. 6. The effects of different CNTs concentration on leaf area of the Rosemary plants.

شکل ۶- تأثیر غلظت‌های مختلف نانولوله کربن بر سطح برگ گیاهچه‌های رزماری.

وزن تر

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تأثیر غلظت نانولوله‌های کربن بر شاخص وزن تر در سطح احتمال یک درصد بر این شاخص معنی‌دار بود. مقایسه میانگین داده‌ها نیز نشان داد بیشترین (۴/۷۴ گرم) و کمترین (۲/۹۵ گرم) وزن تر گیاه به ترتیب از تیمار ۹۰ میلی‌گرم بر لیتر نانولوله‌های کربن و شاهد به دست آمد (شکل ۷).

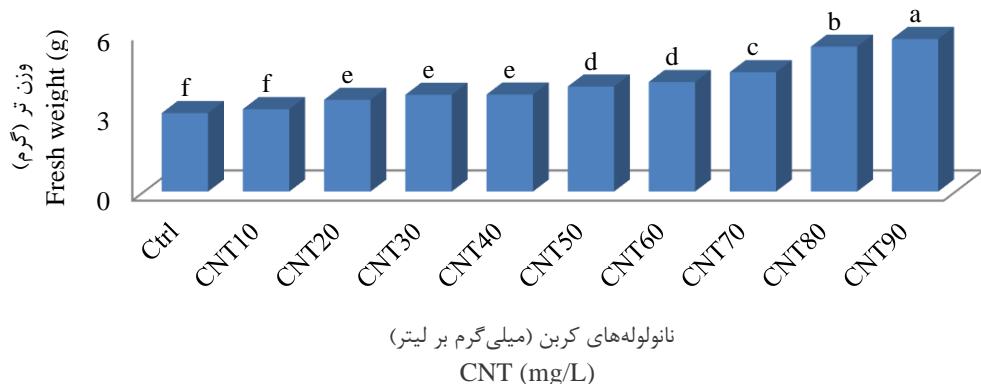


Fig. 7. The effects of different CNTs concentration on wet weight of the Rosemary plants.

شکل ۷- تأثیر غلظت‌های مختلف نانولوله کربن بر وزن تر گیاهچه‌های رزماری.

میزان کلروفیل a

نتایج حاصل از تجزیه واریانس تأثیر نانولوله‌های کربن بر میزان کلروفیل a گیاه نشان داد در سطح احتمال یک درصد بر این شاخص معنی‌دار بود. مقایسه میانگین داده‌ها بر میزان کلروفیل گویای این مطلب است که به موازات افزایش نانولوله‌های کربن میزان کلروفیل افزایش می‌یابد. بیشترین میزان کلروفیل a (۱۰/۹۴ میلی‌گرم در هر گرم) مربوط به تیمار ۸۰ و ۹۰ میلی‌گرم بر لیتر و کمترین میزان کلروفیل a تیمار شاهد (۳/۳۳ میلی‌گرم در هر گرم) و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نانولوله‌های کربن مشاهده شد که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشتند (شکل ۸).

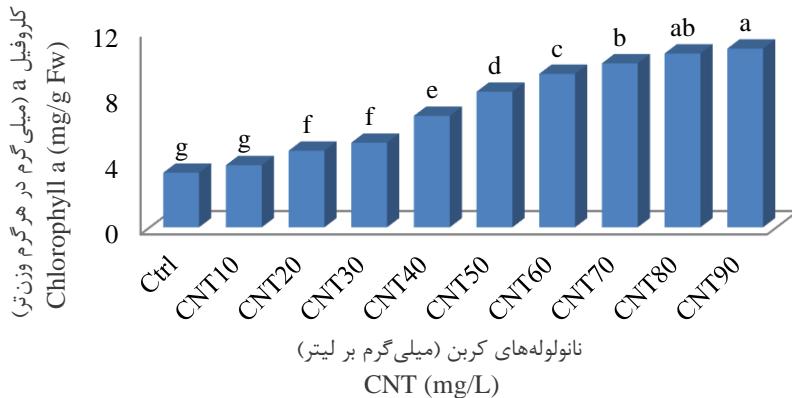


Fig. 8. The effects of different CNTs concentration on chlorophyll a content of Rosemary plants.

شکل ۸- تأثیر غلظت‌های مختلف نانولوله‌کربن بر میزان کلروفیل a در گیاه رزماری.

میزان کلروفیل b

نتایج تجزیه واریانس و مقایسه میانگین تأثیر نانولوله‌های کربن بر میزان کلروفیل b در گیاهان تیمار شده با نانولوله‌های کربن در سطح احتمال یک درصد بر این شاخص معنی‌دار بود. بیشترین میزان کلروفیل b (۴/۲۱ میلی‌گرم در هر گرم) مربوط به تیمار ۹۰ میلی‌گرم بر لیتر نانولوله‌های کربن و کمترین میزان کلروفیل a تیمار شاهد (۱/۰۶ میلی‌گرم در هر گرم) و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نانولوله‌های کربن به دست آمد (شکل ۹).

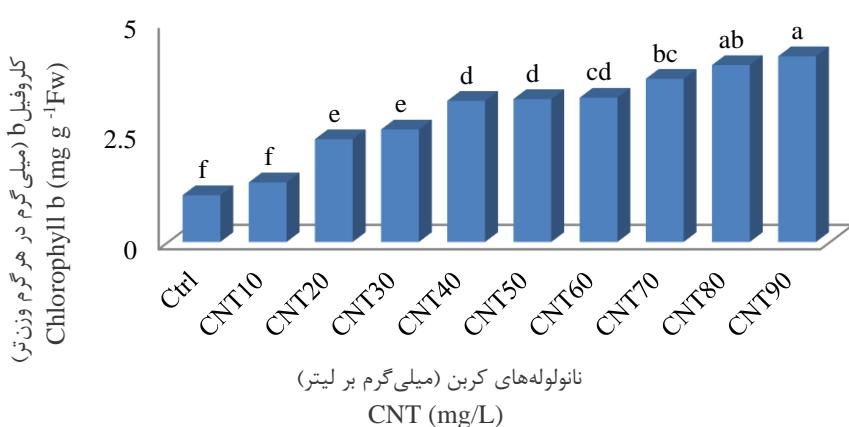


Fig. 9. The effects of different CNTs concentration on chlorophyll b content of the Rosemary plants.

شکل ۹- تأثیر غلظت‌های مختلف نانولوله‌کربن بر میزان کلروفیل b گیاه رزماری.

میزان کلروفیل کل

نتایج حاصل از تجزیه واریانس و مقایسه میانگین تأثیر نانولوله‌های کربن بر میزان کلروفیل کل برگ گیاه رزماری نشان داد در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. تأثیر نانولوله‌های کربن بر میزان کلروفیل کل گیاه نشان داد که استفاده از این ماده در غلظت‌های بیشتر از ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر باعث افزایش محتوای کلروفیل کل نسبت به شاهد می‌شود. بیشترین میزان کلروفیل کل (۱۵/۱۵ میلی‌گرم در هر گرم) مربوط به تیمار نانولوله‌های کربن در غلظت ۹۰ میلی‌گرم بر لیتر و کمترین میزان کلروفیل کل در تیمار شاهد (۴/۴ میلی‌گرم در هر گرم) مشاهده گردید که اختلاف معنی‌دار داشتند (شکل ۱۰).

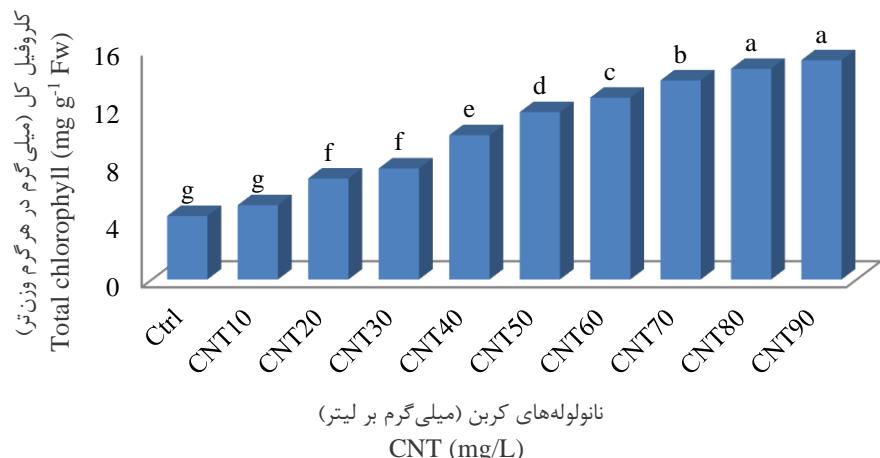


Fig. 10. The effects of different CNTs concentration on total chlorophyll content of the Rosemary plants.

شکل ۱۰- تأثیر غلظت‌های مختلف نanolوله کربن بر میزان کلروفیل کل گیاه رزماری.

میزان کاروتنوئید

نتایج حاصل از تجزیه واریانس تأثیر نanolوله‌های کربن بر محتوای کاروتنوئید در سطح احتمال یک درصد بر گیاه رزماری معنی‌دار بود. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که غلظت‌های مختلف نanolوله‌های کربن به طور معنی‌داری موجب افزایش کاروتنوئیدها نسبت به شاهد می‌شود. بیشترین میزان کاروتنوئید (۰/۵۷ میلی‌گرم در هر گرم) مربوط به غلظت‌های ۹۰ و ۹۰ میلی‌گرم بر لیتر نanolوله‌های کربن و کمترین (۰/۳۲ میلی‌گرم در هر گرم) در تیمار شاهد به دست آمد که اختلاف معنی‌دار داشتند (شکل ۱۱).

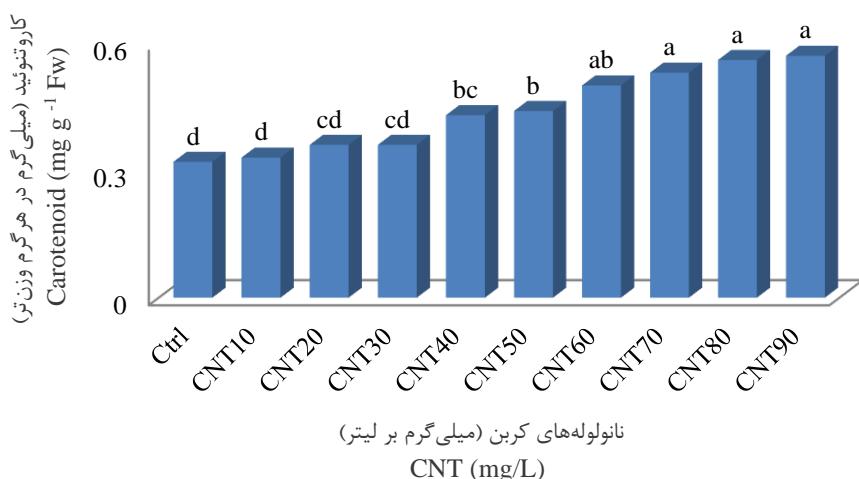


Fig. 11. The effects of different CNTs concentration on carotenoid content of the Rosemary plants.

شکل ۱۱- تأثیر غلظت‌های مختلف نanolوله کربن بر میزان کاروتنوئید گیاه رزماری.

میزان فنول کل

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تأثیر نanolوله‌های کربن بر میزان فنول کل اثر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد بر این شاخص داشت. مقایسه میانگین داده‌ها بر میزان فنول کل گیاه نشان داد که با افزایش غلظت نanolوله‌های کربن میزان فنول کل هم افزایش می‌یابد. بیشترین میزان فنول کل (۱۸۳ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم) در غلظت ۹۰ میلی‌گرم بر لیتر نanolوله‌های کربن و کمترین میزان فنول کل (۴۳/۹ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم) در نمونه‌های شاهد مشاهده گردید که اختلاف معنی‌دار داشتند (شکل ۱۲).

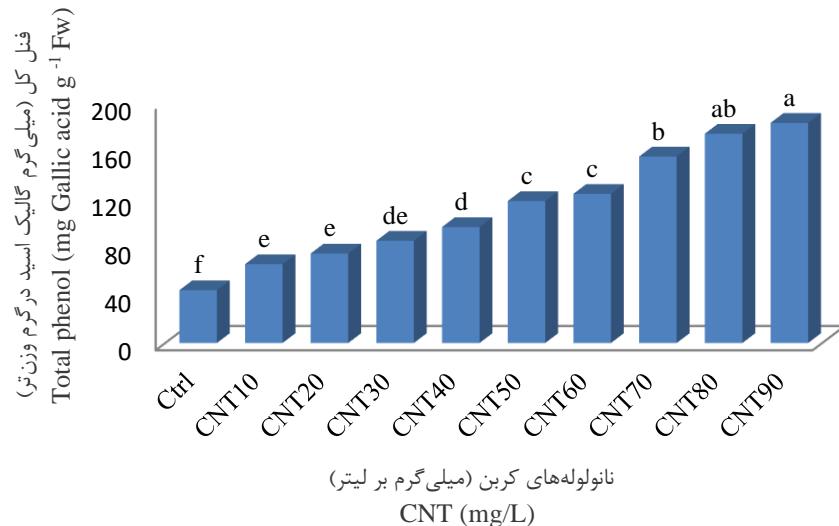


Fig. 12. The effects of different CNTs concentration on total phenol content of the Rosemary plants.

شکل ۱۲- تأثیر غلظت‌های مختلف نانولوله کربن بر میزان فنول کل گیاه رزماری.

میزان فلانوئید

نتایج حاصل از تجزیه واریانس در مورد ارزیابی میزان تأثیر نانولوله‌های کربن بر میزان فلانوئید گیاه در هر سه طول موج مورد بررسی ۳۰۰، ۲۷۰ و ۳۳۰ نانومتر نشان داد در سطح احتمال یک درصد بر این شاخص معنی دار بود. مقایسه میانگین تأثیر داده‌ها بر میزان فلانوئید گیاه رزماری در هر سه طول موج مورد بررسی نشان داد که با افزایش غلظت نانولوله‌های کربن مقدار فلانوئید افزایش معنی داری نسبت به نمونه‌های شاهد نشان داد به طوری که بیشترین میزان فلانوئید (۰/۰۵۸ میلی مولار در هر گرم) در غلظت ۹۰ میلی گرم بر لیتر نانولوله‌های کربن در طول موج ۲۷۰ نانومتر و کمترین (۰/۰۱۵ میلی مولار در هر گرم) در طول موج ۳۳۰ نانومتر در نمونه‌های شاهد مشاهده گردید که اختلاف معنی دار داشتند (شکل ۱۳، ۱۴ و ۱۵).

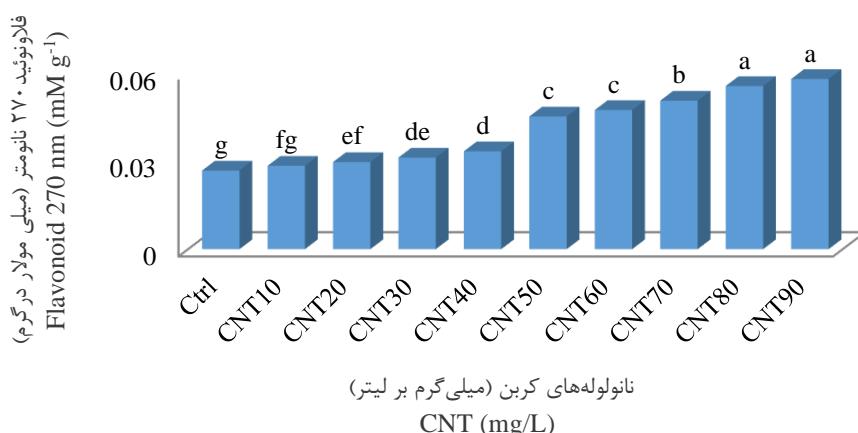


Fig. 13. The effects of different CNTs concentration on flavonoid content of Rosemary plants in 270 nm wave length.

شکل ۱۳- تأثیر غلظت‌های مختلف نانولوله کربن بر میزان فلانوئید گیاه رزماری در طول موج ۲۷۰ نانومتر.

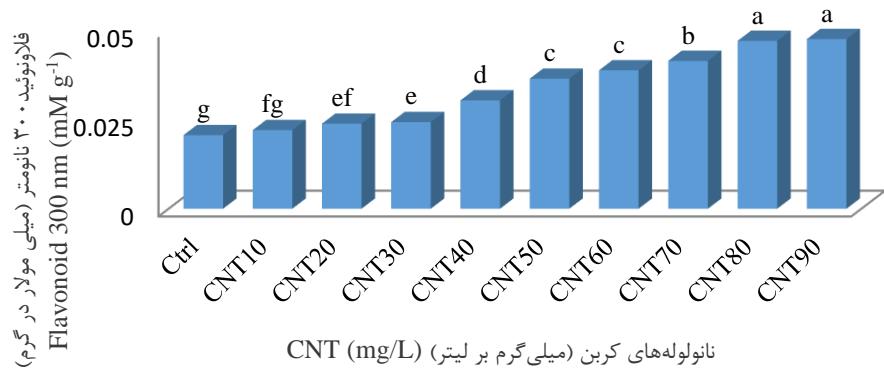


Fig. 14. The effects of different CNTs concentration on flavonoid content of Rosemary plants in 300 nm wave length.

شکل ۱۴- تأثیر غلظت‌های مختلف نanolوله کربن بر میزان فلانوئید گیاه رزماری در طول موج ۳۰۰ نانومتر.

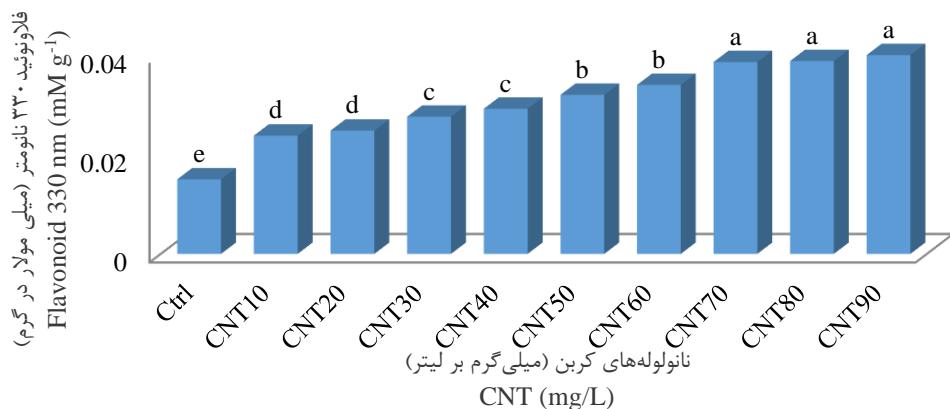


Fig. 15. The effects of different CNTs concentration on flavonoid content of Rosemary plants in 330 nm wave length.

شکل ۱۵- تأثیر غلظت‌های مختلف نanolوله کربن بر میزان فلانوئید گیاه رزماری در طول موج ۳۳۰ نانومتر.

بحث

نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر نشان داد که کاربرد نanolوله‌های کربنی تک جداره در محیط کشت رزماری سبب افزایش معنی‌دار شاخص‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی آن شامل درصد بازیابی، تعداد برگ و ارتفاع گیاهچه‌های بازیابی شده، سطح برگ و وزن تر، همچنین کلروفیل a، کلروفیل b، کارتوئید و فنول کل گردیده است. در پژوهش‌های مشابه نیز، Heydari (۲۰۱۳) گزارش نمود که کاربرد نanolوله‌های کربنی چند جداره سبب افزایش درصد پینه‌زایی، رشد پینه، القاء اندام‌های شبه پذایه، سرعت و میزان پرآوری گیاهچه و همچنین تعداد برگ، ارتفاع و وزن تر گیاهچه‌های بازیابی شده در گیاه آنتوریوم در شرایط درون شیشه‌ای شده است. در پژوهشی، Taha و همکاران (۲۱) گزارش کردند که کاربرد ریزلوله‌های کربنی چند جداره سبب افزایش معنی‌دار تشکیل رویان‌های سوماتیکی خرما و همچنین افزایش معنی‌دار تعداد برگ، طول و تعداد ریشه و ارتفاع گیاهچه‌های حاصل از رویان‌های سوماتیکی شده است. در پژوهش دیگری در زمینه تأثیر نanolوله‌های کربنی بر شاخص‌های رشدی درون شیشه‌ای پروانش مشخص شد که غلظت‌های ۵۰ تا ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر این ترکیبات سبب افزایش معنی‌دار وزن تر برگ، سطح برگ، وزن تر کل، طول ریشه و همچنین میزان کلروفیل این گیاه نسبت به شاهد

شده است. همچنین افزایش وزن تر پینه تنباقو^۱ (۱۵)، مرزه خوزستانی^۲ (۹) و مریم گلی^۳ (۴) در اثر کاربرد نانولوله‌های کربنی گزارش شده است. گزارش‌های مذکور با نتایج به دست آمده در این پژوهش هم راستا می‌باشند. یکی از دلایل احتمالی تأثیر نانولوله‌های کربنی بر شاخص‌های رشدی گیاهان را می‌توان به مشابهت عملکرد آن‌ها با سایتوکینین‌ها مرتبط دانست. از مهم‌ترین دلایل برای اثبات تشابه در عملکرد نانولوله‌های کربنی و سایتوکینین‌ها، می‌توان به نقش آن‌ها در چرخه یاخته‌ای اشاره نمود. سایتوکینین‌ها از طریق افزایش بیان ژن CycD3 در مراحل G1 تا S چرخه یاخته‌ای بر تقسیم یاخته‌ای در گیاه تأثیر می‌گذارند. در کشت یاخته‌ای آرابیدوپسیس^۴ مشخص شده است که بیان ژن CycD3 در اثر کاربرد سایتوکینین و ساکاراز در مرحله G1 و اندکی قبل از مرحله S الفا می‌گردد. ژن CycD3 در فرایندهای رشد و تمایز بافت‌های گیاهی نقش مهمی دارد و بیان این ژن در بافت‌های در حال پرآوری از مریستم، سرآغازه برگ‌های جوان، جوانه‌های جانی و بافت‌های آوندی و پروکامبیوم برگ‌های بالغ به اثبات رسیده است. دیگر مکانیسم تأثیر سایتوکینین‌ها بر تنظیم چرخه یاخته‌ای از طریق تأثیر بر بیان ژن CDC25 می‌باشد که این ژن نیز سبب بیان ژن CDKA/B شده و بیان این ژن چرخه یاخته‌ای را در انتقال از مرحله G2 به M کنترل می‌کند. افزایش ۱۵ برابر در بیان ژن CycB که نقش تنظیم‌کننده در چرخه تقسیم یاخته‌ای دارد، در اثر کاربرد نانولوله‌های کربنی کربوکسیله در کشت یاخته‌ای پینه تنباقو گزارش شده است. مشخص شده که بیان ژن CycB1 نیز سبب بیان ژن CDKA/B می‌شود. با توجه به این که هر دو ژن CycB و CycD3 از خانواده ژن‌های سیکلین بوده و در چرخه تقسیم یاخته‌ای نقش دارند و همچنین مسیر مشابه سایتوکینین‌ها و ریزلوله‌های کربنی در تنظیم چرخه یاخته‌ای از مرحله G2 به M می‌توان نتیجه گرفت که ممکن است نانولوله‌های کربنی فعالیت شبه سایتوکینینی داشته و یا پاسخ‌هایی مشابه سایتوکینین‌ها ایجاد می‌کنند. تأثیر نانولوله‌های کربنی چند جداره، بر افزایش بیان برخی ژن‌های دیگر نیز گزارش شده است (۱۵). در پژوهش حاضر، مشاهده شد که با افزایش غلظت نانولوله‌های کربنی تک جداره در محیط کشت رزماری از ۹۰ تا ۹۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، میزان فنول کل نیز به طور معنی‌داری افزایش یافت و بیشترین میزان فنول کل در تیمار ۹۰ میلی‌گرم بر لیتر ثبت شد. افزایش ترکیبات فنولی در پاسخ به کاربرد نانولوله‌های کربنی در کشت پینه مرزه خوزستانی (۹) و کشت سوسپانسیون مریم گلی (۴) نیز مشاهده شده است که در هر سه گزارش افزایش میزان ترکیبات فنولی همراه با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند کاتالاز و پراکسیداز و همچنین افزایش سطح پراکسیدید هیدروژن همراه بوده است. در حقیقت می‌توان اینطور نتیجه گرفت که نانولوله‌های کربنی سبب القاء شرایط تنش در گیاهان شده و از طریق افزایش اکسیژن‌های فعال در سلول‌های گیاهی، میزان تولید ترکیبات فنولی را افزایش می‌دهند (۵)، زیرا ترکیبات فنولی اولین پاسخ گیاهان برای مقابله با اکسیژن‌های فعال در شرایط تنش هستند. در پژوهشی توسط Ghorbanpour و Hadian (۲۰۱۵) اثرات نانولوله‌های کربنی تک جداره را روی القاء پینه و بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در گیاه مرزه در شرایط درون شیشه‌ای بررسی و گزارش گردید که که محتوای فلاونوئید، فنول کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی با قرار گرفتن در معرض سطوح (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) نانولوله‌های کربنی چند جداره در مقایسه با شاهد به طور معنی داری افزایش یافت. آن‌ها همچنین اشاره کردند که تغییرات در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه به محض قرار گرفتن در معرض نانولوله‌های کربنی چند دیواره می‌تواند مربوط به فعالیت آنزیم‌های مختلف مانند فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL)، پراکسیداز (POD) و پلی فنول اکسیداز (PPO) باشد.

طبق نظریه Khodakovskaya و همکاران، ممکن است ورود نانو ذرات به درون بافت‌های گیاه، توسط گیاه یک تنش زیستی مانند حمله عامل بیماری‌زا یا گیاهخواران احساس شده و سبب تغییر یا فعل شدن مسیرهای مهم انتقال سیگنال‌های تنشی در گیاه و در نتیجه تغییر در برخی پاسخ‌های فیزیولوژیکی گیاه گردد. علت بیان این نظریه افزایش بیان ژن‌های رمز کننده آنزیم‌های تریئونین دی‌آمیناز، ملویدیژن و اندوپروتئاز در ریشه‌های گوجه‌فرنگی تیمار شده به نانولوله‌های کربنی می‌باشد. بیان این ژن در گوجه‌فرنگی در هنگام حمله عامل بیماری‌زا و گیاهخواران افزایش می‌یابد. ممکن است غلظت‌های بالای نانولوله‌های کربنی، سبب اختلال در پاسخ‌های فیزیولوژیکی گیاه شده و باعث کاهش رشد گردد. در پژوهشی، Begum و همکاران (۲) بیان نمودند در اثر کاربرد غلظت‌های بالای نانولوله‌های کربنی چند جداره (۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) در مرحله جوانه‌زنی بذرهای اسفناج قرمز، خیار و کاهو، سبب افزایش در میزان تولید اکسیژن‌های فعال در بافت‌های گیاه می‌گردد

که این امر سبب کاهش طول ساقه چه و ریشه‌چه دانهال می‌شود (۲۲). افزایش میزان بیان زن‌های مرتبه با تنش و همچنین میزان اکسیژن‌های فعال در پاسخ به نانولوله‌های کربنی توسط پژوهشگران دیگر نیز به اثبات رسیده است (۹). کلروفیل a در غلظت بالاتری نسبت به کلروفیل b، معمولاً ۳ به ۱ است بنابراین کلروفیل a مستعد دریافت بیشتری نانولوله‌های کربن به عنوان فاکتورهای محیطی است. نانولوله‌های کربنی با نفوذ به یاخته‌های اپیدرم و انتقال از طریق اندوسیتوز به دیواره‌های یاخته‌ای، میتوکندری‌ها و کلروپلاست‌ها را دارند (۲۳). در گیاه اسفناج کاربرد نانولوله‌های کربن به دلیل عمل تحریک در جذب نور ناشی از نفوذ نانولوله‌های کربن به غشاهای کلروپلاست، باعث افزایش فعالیت الکترون و فعالیت فتوستنتزی می‌شود (۶)، به همین ترتیب Giraldo و همکاران (۲۰۱۴) نشان داد که استفاده از نانومواد کربن در اسفناج باعث افزایش تعداد و اندازه کلروپلاست‌ها شد و در نتیجه، افزایش کلروفیل‌ها و فعالیت فتوستنتزی مشاهده شد. نتایج کاربرد نانولوله‌های کربن چندجباره بر گیاه سویا نشان داد که باعث جذب قابل توجه روی و مس در گیاه می‌شود و غلظت منیزیم حتی افزایش یافته است. میزان کلروفیل موجود در برگ‌های گوجه فرنگی تحت تیمار با نانولوله‌های کربنی در بین تیمارها قابل توجه بود، از آنجا که تمام تیمارهای اعمال شده با نانولوله‌های کربنی میزان کلروفیل را افزایش داد. بهترین پاسخ را ۶۶٪ بیشتر از شاهد در ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در نانولوله‌های کربن مشاهده شد و افزایش کلروفیل کل هم ناشی از افزایش در کلروفیل a بود، افزایش کلروفیل b هم ۲۵٪ درصد نسبت به شاهد نشان داد. نتایج به دست آمده در این کار مطابق با گزارش‌های موجود در متن است که نشان می‌دهد استفاده از نانولوله‌های کربن باعث پاسخ‌های مطلوب در رنگدانه‌های فتوستنتزی گیاه می‌شود. که به طور بالقوه می‌تواند ظرفیت فتوستنتزی را افزایش دهد.

نتیجه‌گیری

به طور خلاصه، جزئیات اثرات نانولوله‌های کربنی تک جداره بر خصوصیات گیاهچه‌های رزماری مورد بررسی قرار گرفت. مشاهدات تجربی نشان داد که نانولوله‌ها می‌توانند به طور قابل توجهی باعث افزایش رشد، پرآوری، تولید ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در گیاهچه‌های رزماری شوند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت نانولوله‌های کربنی با مکانیسم‌های خاصی از جمله؛ افزایش جذب آب و املاح، باعث ترویج رشد و طویل شدن یاخته‌ها و همچنین بهبود فعالیت یاخته‌های گیاهی می‌شوند. به دنبال افزایش رشد یاخته‌ها و افزایش سرعت متابولیسم در آن‌ها، سرعت رشد و پرآوری گیاهچه‌ها هم بیشتر شده و متابولیت‌های تولیدی توسط یاخته‌ها با سرعت بیشتری افزایش پیدا می‌کنند. این چنین به نظر می‌آید که غلظت‌های به کار برده شده در این آزمایش برای گیاهچه‌های رزماری مطلوب خواهد بود. غلظت‌های ۹۰ تا ۹۰ میلی‌گرم در لیتر می‌تواند به عنوان غلظت‌های مناسب جهت برای بهبود شاخص‌های رشدی و فیزیولوژیکی برای این گیاه معرفی گردد. این بژوهوش علاوه بر این که از نظر استفاده کاربردی نانو ذرات در علوم کشاورزی حائز اهمیت است، بلکه افق‌های جدیدی برای درک تأثیر نانو مواد بر افزایش رشد و تولید برخی از متابولیت‌های ثانویه گیاهان ارائه می‌کند. کاربرد نانولوله‌ها در فناوری‌های مربوط به نانو کشاورزی آینده‌ای بسیار روشنی دارد. دانشمندان کشاورزی و پژوهشگران حوزه کشاورزی وظیفه مشترک دارند تا دوز صحیح، روش کار و مدت زمان استفاده از این ترکیب را به منظور بهره‌مندی از مزایای استفاده از نانولوله‌ها شناسایی کنند.

References

منابع

1. Arnon, A., 1967. Method of extraction of chlorophyll in the plants. *J. Agron.* 23: 112-121.
2. Begum, P., R. Ikhtiari, B. Fugetsu, M. Matsuoka, T. Akasaka and F. Watari. 2012. Phytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes assessed by selected plant species in the seedling stage. *Appl. Surf. Sci.*, 262: 120-124.
3. Bhati, A., G. Gunture, K.M. Tripathi, A. Singh, S. Sarkar and S.K. Sonkar. 2018. Exploration of nano carbons in relevance to plant systems. *New J. Chem.* 42: 16411-16427.
4. Chamani, E., F. Narimaniyan, Y. Pourbeyrami Hir and H.R. Heydari. 2021. Effects of various nitrogen sources on some morpho-physiological characteristics of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) under in vitro conditions. *Iranian J. Med. Arom. Plant Res.* 37: 549-562.
5. Chen, L., J. Yang, X. Li, T. Liang, C. Nie, F. Xie, K. Liu, X. Peng and J. Xie. 2020. Carbon nanoparticles

- enhance potassium uptake via upregulating potassium channel expression and imitating biological ion channels in BY-2 cells. *J. Nanobiotechnol.* 18: 21.
6. Chichiriccò, G., and A. Poma. 2015. Penetration and toxicity of nanomaterials in higher plants. *J. Nanomater.*, 5: 851-873.
 7. Coskun, Y., R.E. Duran and S. Kilic. 2019. Striking effects of melatonin on secondary metabolites produced by callus culture of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 138: 89-95.
 8. Ghasempour, M., A. Iranbakhsh, M. Ebadi and Z. Oraghi Ardebili. 2019. Multi-walled carbon nanotubes improved growth, anatomy, physiology, secondary metabolism, and callus performance in *Catharanthus roseus*: an *in vitro* study. *Biotechnology*, 9: 404.
 9. Ghorbanpour, M. and J. Hadian. 2015. Multi-walled carbon nanotubes stimulate callus induction, secondary metabolites biosynthesis and antioxidant capacity in medicinal plant *Satureja khuzestanica* grown *in vitro*. *Carbon*, 94: 749-759.
 10. Giraldo, J., P.M.P. Landry, S.M. Faltermeier, T.P. Mcnicholas, N.M. Iverson, A.A. Boghossian, N.F. Reuel, A. J. Hilmer, F. Sen, J. A. Brew, M. S. Strano. 2014. Plant nanobionics approach to augment photosynthesis and biochemical sensing. *Nat. Mater.* 13: 1-400
 11. Heydari, H. 2013. A Study on Application of Carbon Nanotubes (CNTs) as a Plant Growth Regulator in *Anthurium andeanum* L. *Micropropagation*, University of Tarbiat Modares. Thesis M.Sc. 35-70.
 12. Heydari, H.R., E. Chamani and B. Esmaelpour. 2020. Cell line selection through gamma irradiation combined with multi-walled carbon nanotubes elicitation enhanced phenolic compounds accumulation in *Salvia nemorosa* cell culture. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 142: 353-367.
 13. Jordan, J.T., K.P. Singh and J.E. Cañas-Carrell. 2018. Carbon-based nanomaterials elicit changes in physiology, gene expression, and epigenetics in exposed plants: A review. *Curr. Opin. Environ. Sci.* 6: 29-35.
 14. Khodakovskaya, M.V., B.S. Kim, J.N. Kim ,M. Alimohammadi, E. Dervishi, T. Mustafa and C.E. Cernigla. 2013. Carbon nanotubes as plant growth regulators: Effects on tomato growth, reproductive system, and soil microbial community. *Small*, 9: 115-123.
 15. Khodakovskaya, M.V ,K. De Silva, A.S. Biris, E. Dervishi and H. Villagarcia. 2012. Carbon nanotubes induce growth enhancement of tobacco cells. *ACS Nano*, 6: 2128-2135.
 16. Kralova, K. and J. Jampilek, 2021. Responses of Medicinal and Aromatic Plants to Engineered Nanoparticles. *Appl. Sci.* 11.
 17. Krizek, DT., S.J. Britz and R.M. Mirecki. 1998. Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth cv. New Leaf Fire lettuce. *Physiol. Plant.* 103: 1-7.
 18. Lamponi, S., M.C. Baratto, E. Miraldi, G. Baini and M. Biagi. 2021. Chemical profile, antioxidant, anti-proliferative, anticoagulant and mutagenic effects of a hydroalcoholic extract of Tuscan *Rosmarinus officinalis*. *Plants*, 10: 97.
 19. Phillipson, J.D. 2001. Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochemistry*, 56: 237-243.
 20. Slinkard, K. and V.L. Singleton. 1977. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *Am J Enol Vitic.*, 28: 49-55.
 21. Taha, R.A., M.M .Hassan, E.A. Ibrahim, N.H. Abou Baker and E.A. Shaaban. 2016. Carbon nanotubes impact on date palm *in vitro* cultures. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 127: 525-534.
 22. Younes, N., A.M.F. Dawood, A.A. Wardany. 2019. Biosafety assessment of graphene nanosheets on leaf ultrastructure, physiological and yield traits of *capsicum Annum* L. and *Solanum melongena* L. *Chemosphere*, 228: 318-327.
 23. Yousefi, S., D. Kartoolinejad and R. Naghdi. 2017. Effects of priming with multi-walled carbon nanotubes on seed physiological characteristics of Hopbush (*Dodonaeaviscosa* L.) under drought stress. *Int. J. Environ. Sci.* 74: 528-539.

24. Yue, W., Q.L. Ming, B. Lin, K. Rahman, C.J. Zheng, T. Han and L.P. Qin. 2016. Medicinal plant cell suspension cultures: pharmaceutical applications and high-yielding strategies for the desired secondary metabolites. *Crit. Rev. Biotechnol.* 36: 215-232.
25. Zhao, G., Y. Zhao, W. Lou, J. Su, S. Wei, X. Yang, R. Wang, R. Guan, H. Pu and W. Shen. 2019. Nitrate reductase-dependent nitric oxide is crucial for multi-walled carbon nanotube-induced plant tolerance against salinity. *Nanoscale*, 11:10511-10523.

Investigation on the Effects of Carbon Nanotubes application on Regeneration of the Rosemary Plants under *In vitro* Conditions

Y. Pourbeyrami Hir*, **M. Khosravi Mejdar**, **M. Torabi Giglou**, **E. Chamani**, **H. Maleki Lajayer** and **M. Ahadzadeh¹**

Due to the distinctive physicochemical properties of the carbon nanotubes (CNTs) in enhancing photosynthesis efficiency, the aim of this study was to evaluate the effect of single-walled CNTs on morphological and physiological characteristics of rosemary. The experiment was performed in a completely randomized design with 10 concentrations of carbon nanotubes in 5 replications. The effect of CNTs on the morphological and physiological characteristics of rosemary was significant. Data means comparison showed that the highest height was observed at a concentration of 90 mg L^{-1} and the lowest was in control. The lowest regeneration percentage was in control. However, the results showed that the most and least leaf number was obtained from CNTs at the rate of 90 mg L^{-1} and control. The 90 mg L^{-1} concentration of CNTs had the highest leaf area and fresh weight. Also, the means comparison of physiological traits showed that the highest and lowest amount of chlorophyll a, chlorophyll b, carotenoid, flavonoid and total phenol were observed in CNTs at the rate of 90 mg L^{-1} and control, respectively. It is hoped that this method will be used for regeneration and the use of secondary metabolites in other plants.

Keywords: Carbon nanotubes, Rosemary, Secondary metabolites, Tissue culture.

1. Assistant Professor, Former M.Sc. Student, Associate Professor, Professor, Assistant Professor and M.Sc. Student, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran, respectively.

* Corresponding Author, Email: (Younes_ph62@uma.ac.ir).