



دانشگاه گنبد کاووس

نشریه "تحقیقات کاربردی اکوفیزیولوژی گیاهی"

دوره ششم، شماره دوم، پاییز و زمستان ۹۸

<http://arpe.gonbad.ac.ir>

## اثر نانولوله‌های کربن چند جداره بر مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی، قندها و مالون دی‌آلدئید در گیاه کرچک

### زهرا فتحی

گروه زیست‌شناسی، آموزش و پرورش شهرستان طبس

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۴/۱۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۸/۲۳

### چکیده

**مقدمه:** گیاه کرچک (*Ricinus communis* L.) متعلق به خانواده فرقیون می‌باشد که یک خانواده متنوع بوده و از لحاظ اقتصادی از گیاهان گلدار مهم می‌باشد. این گیاه دارای اثرات دارویی بسیار مفید می‌باشد. نانولوله‌های کربن دارای خصوصیات منحصر به فرد بوده و کاربردهای وسیع در صنایع مختلف دارند. فناوری نانو کاربردهای وسیعی در مراحل تولید و فرآوری محصولات کشاورزی دارد. در این تحقیق، اثر غلظت‌های نانو لوله کربنی روی رنگیزه‌های فتوسنتزی، قند و مالون دی‌آلدئید گیاه کرچک بررسی شد.

**مواد و روش‌ها:** گیاهان در شرایط گلخانه‌ای با محلول‌هایی حاوی غلظت‌های مختلف نانولوله کربنی (صفر، ۷۵، ۱۰۰، ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰  $\mu\text{g/ml}$ ) صبح‌ها به صورت اسپری برگی هفته‌ای رشد کردند. بدلیل اینکه سنجش‌ها قبل از ورود به مرحله زایشی باید انجام می‌گرفت، نمونه‌های مورد نظر از بافت‌های گیاهان ۴۵ روزه برداشت شد و جهت سنجش صفات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی مورد بررسی (وزن خشک ریشه و اندام هوایی، رنگیزه‌های فتوسنتزی، مالون دی‌آلدئید و قند) قرار گرفت.

**نتایج:** بیشترین وزن خشک ریشه و وزن تر اندام هوایی در تیمار ۷۵  $\mu\text{g/ml}$ ، بیشترین نسبت وزن تر به خشک ریشه و اندام هوایی، مربوط به تیمار ۲۵۰  $\mu\text{g/ml}$  و کمترین مربوط به شاهد و تیمار ۷۵  $\mu\text{g/ml}$  می‌باشد. کمترین میزان کلروفیل a, b, a+b و کل در شاهد و بیشترین در تیمار ۱۰۰  $\mu\text{g/ml}$  مشاهده شد که از نظر آماری با گروه شاهد دارای اختلاف معنی‌دار بود. کمترین میزان مالون دی‌آلدئید در شاهد و بیشترین در تیمار ۱۲۵  $\mu\text{g/ml}$  مشاهده شد که از نظر آماری با گروه شاهد دارای اختلاف معنی‌دار بود. بیشترین میزان قند در تیمار ۵۰۰  $\mu\text{g/ml}$  و کمترین در تیمار ۱۰۰  $\mu\text{g/ml}$  مشاهده شد.

**نتیجه‌گیری:** بررسی نتایج، کاهش وزن خشک ریشه و اندام هوایی را در غلظت ۲۵۰  $\mu\text{g/ml}$  نشان داد. نانولوله کربنی به طور معنی‌داری سبب افزایش کلروفیل a, b, a+b و کل در غلظت ۱۰۰  $\mu\text{g/ml}$  و مالون دی‌آلدئید در غلظت ۱۲۵  $\mu\text{g/ml}$

\*نویسنده مسئول: zhr.fathi@gmail.com

شد؛ در حالی که مقدار قندها در غلظت ۱۰۰  $\mu\text{g/ml}$  کاهش یافت. با افزایش فتوسنتز و میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی، در غلظت‌های کم نانولوله کربنی ۷۵  $\mu\text{g/ml}$ ، رشد و بیومس گیاه و میزان قند نیز افزایش یافت. غلظت‌های بالای نانولوله‌های کربنی برای گیاه کرچک سمی بوده و باعث افزایش پراکسیداسیون لیپیدها و کاهش رشد شد که می‌توان از غلظت‌های کم نانولوله کربن برای افزایش میزان محصولات کشاورزی استفاده کرد.

**واژه‌های کلیدی:** رنگیزه، قند، کرچک، مالون دی‌آلدئید، نانولوله کربن

## مقدمه

فناوری نانو یک حوزه در حال توسعه و موثر در تمام زمینه‌های زندگی انسان (Singh *et al.*, 2010) و زمینه رو به رشدی را در علوم زیستی و بیوتکنولوژی (Prabhu *et al.*, 2010) ایجاد می‌کند. نانوبیوتکنولوژی برای پیشرفت کشاورزی و علوم گیاهی مفید می‌باشد. اگرچه در برخی موارد، نانومواد کربنی به عنوان فیتوتوکسیک شناخته شده‌اند. چشم‌انداز آینده نانومواد کربنی به عنوان روشی جهت افزایش تولید چند برابری میوه و محصول می‌باشد (Nel *et al.*, 2013). نانولوله‌های کربنی ( $\text{CNT}^{\text{r}}$ ) گروهی از مواد نانوی کم وزن، محکم، پایدار، میان تهی و دارای خواص فیزیکی و شیمیایی منحصر به فرد هستند (Yuan *et al.*, 2011) که بدلیل ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی منحصر به فرد، بسیار مورد توجه قرار گرفتند (Tiwari *et al.*, 2014). ویژگی فیزیکی و شیمیایی نانومواد کربنی در کشاورزی به منظور افزایش عملکرد محصول، عمدتاً در جوانه‌زنی، رشد ریشه و فتوسنتز استفاده شده است.

نانولوله‌های کربنی چندجداره سنتزی (MWCNTs)، تولید و تجمع انواع اکسیژن فعال، کاهش وزن خشک و محتوای کلروفیل را القا کند (Flores *et al.*, 2014). نانولوله‌های کربنی چندجداره می‌توانند به ریشه نفوذ کرده و به برگ و میوه انتقال یابند (Khodakovskaya *et al.*, 2013). نانولوله‌های کربنی چندجداره سنتزی، در غلظت‌های کم، موجب افزایش رشد و جوانه‌زنی گیاهچه‌های ذرت و در غلظت‌های بالا، آن را کاهش می‌دهند. افزایش رشد عمدتاً از طریق بهبود انتقال آب توسط MWCNT انجام می‌شود. MWCNTها می‌توانند در بهبود جریان آب، بیومس گیاهی و غلظت‌های ضروری کلسیم و آهن، مفید باشند (Tiwari *et al.*, 2014). طی پژوهشی، ارتفاع گوجه فرنگی‌هایی که نانولوله کربن دریافت کرده بودند، نسبت به شاهد کمی بلندتر بود. افزایش تولید گل و میوه در گیاه گوجه فرنگی تحت تیمار نانولوله کربن چند دیواره نیز مشاهده شد. بهبود تقسیم سلولی عامل اصلی افزایش رشد گیاه تحت این تیمار بوده است. بیان آکوآپورین‌ها که تنظیم کننده‌های مهم رشد و نمو گیاهی هستند، در گوجه فرنگی‌های مورد تیمار نانوذره، افزایش یافت (Khodakovskaya *et al.*, 2013).

تیمار نانولوله‌های کربنی چندجداره، وزن خشک سلول‌های آرابیدوپسیس تحت تیمار را کاهش داد (Lin *et al.*, 2009). افزایش کلروفیل و وزن خشک گیاهان مورد تیمار نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم نیز مشاهده شد (Kole *et al.*, 2013). میزان فتوسنتز در گیاهان اسفناج تحت تیمار نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم افزایش یافت (Lin and Xing 2007). افزایش میزان رنگدانه‌های کلروفیل و کاروتنوئید و تولید محصول در گیاهان ذرت تحت تیمار

نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم نیز گزارش شده است (Morteza *et al.*, 2013). افزایش تشکیل کلروفیل، فعالیت ریبولوز بیس فسفات کربوکسیلاز اکسیژناز و میزان فتوسنتز، در گیاهان تحت تیمار نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم گزارش شده است (Zhang *et al.*, 2005).

گیاه کرچک (*Ricinus communis* L.) متعلق به خانواده فرفیون (Euphorbiaceae) است که یک خانواده متنوع و از لحاظ اقتصادی از گیاهان گلدار مهم می‌باشد که در سراسر مناطق گرمسیری جهان عمدتاً به صورت وحشی با کشت دانه‌های روغنی آن، گسترش یافته است (Mani *et al.*, 2013; Prakash and Gupta, 2014). این گیاه دارای اثرات مفیدی به عنوان آنتی‌اکسیدان، آنتی‌هیستامین، ضد دردهای روماتیسمی، اختلالات عصبی، ضد دیابت، درمان زگیل، تومورهای سر و غده پستانی و بسیاری از خواص دارویی دیگر می‌باشد. فعالیت‌های گیاه بدلیل وجود ترکیبات شیمیایی مهم مانند فلاونوئیدها، ساپونین‌ها، گلیکوزیدها، آلکالوئیدها و استروئیدها می‌باشد (Prakash and Gupta, 2014).

تاثیر انواع نانولوله‌های کربنی بر رشد و نمو گیاهان امروزه مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است. به همین علت در این پژوهش تاثیر نانولوله‌های کربنی بر رشد و برخی از صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه کرچک بررسی شد. از آنجائیکه مالون دی‌آلدئید به‌عنوان شاخص سمیت گیاه با نانولوله می‌باشد، مقدار این آلدئید اندازه‌گیری شد تا مقاومت و حساسیت این گیاه مشخص شود.

## مواد و روش‌ها

بذرهای *Ricinus communis* L. از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. نانولوله‌های کربنی چندجداره (MWCNT) با اندازه میانگین OD کمتر از ۸ نانومتر و طول حدود ۳۰ میکرومتر از شرکت نوترینو تهران تهیه شد. اندازه نانولوله کربنی چندجداره توسط نانوپار تیکل سایزر انجام شد و پایداری کلوئیدهای تشکیل شده نانولوله های کربنی با استفاده از زتا سایزر انجام شد. مراحل این دو آزمایش در پژوهشکده هوا خورشید، آزمایشگاه مرکزی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد. فاز نانولوله کربنی و درجه خلوص آن توسط دستگاه (XRD) X-ray diffraction در آزمایشگاه تجزیه‌کنندگان کانسارهای بلورین آمیتس شرق واقع در مشهد انجام شد. جهت مطالعه اثر نانولوله‌های کربنی چندجداره بر صفات مورفولوژی و فیزیولوژیکی گیاه کرچک در شرایط گلخانه‌ای با ۶ تیمار در ۳ تکرار (تیمارها شامل غلظت‌های مختلف نانولوله‌های کربنی چندجداره صفر، ۷۵، ۱۰۰، ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰  $\mu\text{g/ml}$ ) انجام شد. هر تیمار شامل ۴ گلدان و هر گلدان حاوی ۱۰ عدد بذر کرچک بود که اسپری برگی محتوی تیمارهای مورد نیاز به صورت هفتگی انجام شد. بدلیل اینکه سنجش‌ها قبل از ورود به مرحله زایشی باید انجام می‌گرفت، بنابراین نمونه‌برداری از گیاهان ۴۵ روزه صورت پذیرفت.

جهت سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدی که یکی از محصولات بارز آن MDA می‌باشد، از سنجش تیوباربیتوریک اسید<sup>۲</sup> استفاده شد که اساس آن تشکیل کمپلکس رنگی تیوباربیتوریک اسید MDA می‌باشد (Velikova *et al.*, 2000; Metwally *et al.*, 2003). ۲۵۰ میلی‌گرم از برگ تازه را با ۵ میلی‌لیتر تری کلرو

استیک اسید<sup>۴</sup> ۱ درصد در هاون چینی ساییده شد. عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰ هزار دور سانتریفیوژ (SIGMA 2-6) گردید. مخلوط واکنش شامل: ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره گیاهی، ۱ میلی‌لیتر محلول تری‌کلرو استیک اسید ۲۰ درصد، ۱ میلی‌لیتر محلول تیوباربیتریک اسید ۰/۵ درصد می‌باشد. مخلوط واکنش به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب جوش، سپس جهت توقف واکنش، به مدت ۵ دقیقه روی یخ قرار گرفتند. سپس سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه انجام شد. جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzo UV/1100) ثبت گردید. غلظت کمپلکس مالون دی‌آلدئید - تیوباربیتریک اسید با استفاده از تفاضل مقدار جذب ۶۰۰ از ۵۳۲ و ضرب در ضریب خاموشی  $10^5 \times 1/5$  بر حسب میکرومول در گرم وزن تر ( $\mu\text{mol/g Fw}$ ) محاسبه گردید (Poonam *et al.*, 2013).

پس از تعیین وزن تر اندام هوایی و وزن تر ریشه با ترازوی ۰/۰۰۱ گرم، آن را در فویل پیچیده و در آن دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت گذاشته تا کاملاً خشک شد. سپس با همان ترازو، وزن خشک اندام هوایی و ریشه اندازه‌گیری شد.

با استفاده از روش آرنون (Arnon, 1994)، مقدار کلروفیل برگ کرچک اندازه‌گیری شد. ۲۵۰ میلی‌گرم بافت تر برگ در ۵ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد در هاون چینی ساییده شد و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۵۰۰ سانتریفیوژ گردید و روشن‌آور به دست آمده با استون ۸۰ درصد به حجم ۲۵ میلی‌لیتر رسانده شد؛ سپس مجدداً سانتریفیوژ شد. جذب عصاره با اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۴۴۰، ۶۴۶، ۶۶۳ و ۶۴۰ نانومتر ثبت شد و میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل، کلروفیل a+b با استفاده از فرمول‌های زیر بر حسب میلی‌گرم در گرم بافت تر برگ ( $\text{mg/g Fw}$ ) محاسبه گردید (Wu and Du, 2008):

$$\text{میلی‌گرم کلروفیل a در گرم بافت تر برگ} = [12/25 (A663) - 2/55 (A646)] \times V/W \times 1000$$

$$\text{میلی‌گرم کلروفیل b در گرم بافت تر برگ} = [20/31 (A646) - 4/91 (A663)] \times V/W \times 1000$$

$$\text{میلی‌گرم کلروفیل a+b در گرم بافت تر برگ} = [17/76 (A646) - 7/34 (A663)] \times V/W \times 1000$$

$$\text{میلی‌گرم کلروفیل کل در گرم بافت تر برگ} = [20 (A646) - 8/02 (A663)] \times V/W \times 1000$$

در این فرمول‌ها: A = میزان جذب نوری عصاره استونی، V = حجم نهایی عصاره استونی حاوی رنگیزه‌های فتوسنتزی (ml)، W = وزن تر برگ (g).

سنجش محتوای قندهای محلول برگ با استفاده از روش فنل سولفوریک<sup>۵</sup> (Dubois *et al.*, 1956) انجام شد. ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت خشک و پودر شده برگ با ۴ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد مخلوط شد. سپس ۲۰ دقیقه در حمام آب گرم ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد (Sunkar, 2010). جهت حذف کلروفیل و ترکیبات چربی دوست، ۱/۵ میلی‌لیتر کلروفرم و جهت جدایی بهتر اتانول و کلروفرم، آب دیونیزه افزوده شد. سانتریفیوژ در ۳۵۰۰ دور به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد، ۱ میلی‌لیتر عصاره با ۱ میلی‌لیتر فنول ۵ درصد مخلوط شد و ۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ به آن افزوده شد. سپس هم زده و مدت نیم ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. جذب نوری

4- Thrichloracetic Acid

5- Phenol Sulphuric Acid

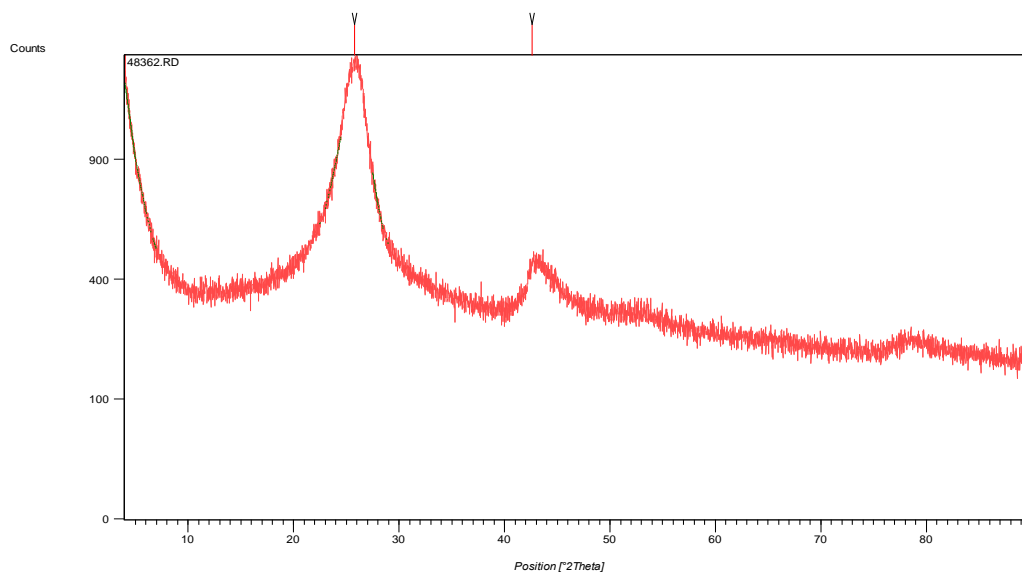
محلول نهایی در طول موج ۴۹۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر سنجش شد. با استفاده از معادله خط منحنی استاندارد گلوکز، غلظت قندهای محلول بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر محاسبه شد.

$$Y = 0/008X + 0/026$$

در این فرمول:  $Y$  = جذب نوری محلول حاوی قند و  $X$  = غلظت قندهای محلول می باشد. برای آنالیز داده ها و رسم نمودارها از نرم افزار SPSS و آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد استفاده گردید. در کلیه نمودارها، بارهای عمودی نشان دهنده SE برای سه تکرار می باشد.

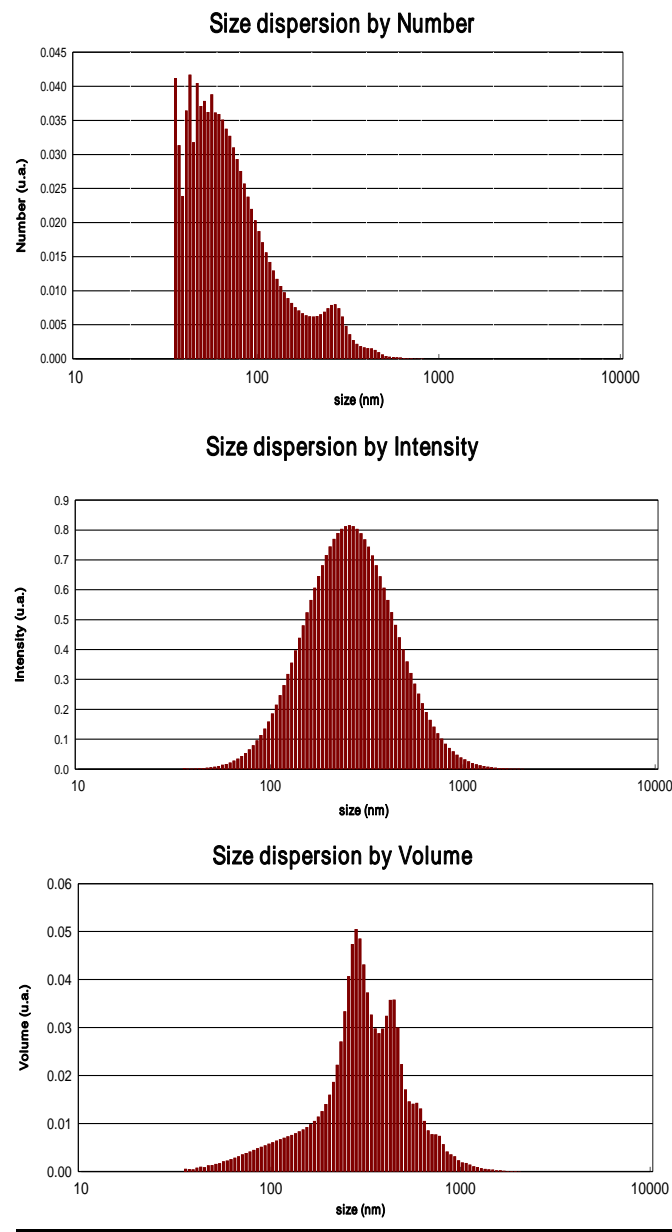
### نتایج

شکل ۱، الگوی XRD نانولوله کربنی چند دیواره را نشان می دهد. عناصر موجود در نانولوله، کربن بوده و دارای یک فاز که همان کربن است می باشد. در این آزمایش فاز مشخص در نمونه دیده می شود که دارای پیک خاصی در شکل باشد. نانولوله کربن مورد نظر با توجه به نمودار قله ندارد و این خود سندی بر نانو بودن ماده است. یعنی بلوری که اندازه درشتی دارد و قادر به عبور نور می باشد در آن مشاهده نشد. شکل ۲، اندازه نانولوله های کربنی چند دیواره را نشان می دهد که بیشترین تعداد نانو لوله ها در محدوده ۳۵ تا ۳۰ نانومتر وجود داشتند. میانگین قطر ذرات  $^6 = 91/3$ ، قطر هیدرودینامیکی ذرات  $^7 = 245/7$ ، شاخص پراکندگی ذرات  $^8 = 0/3$  می باشد.



شکل ۱- الگوی XRD نانولوله کربنی چند دیواره  
Figure 1- XRD pattern of multi-walled carbon nanotubes

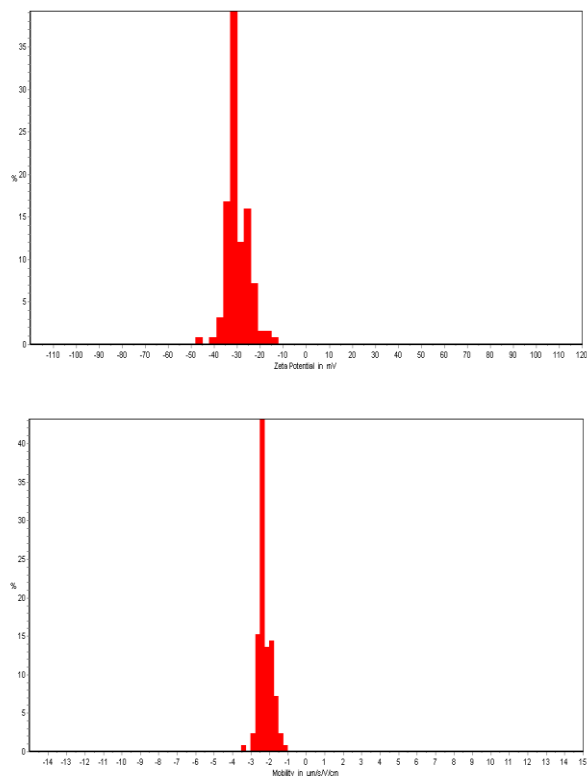
- 6- Dmean
- 7- Zaverage
- 8- PDI



شکل ۲- قطر هیدرودینامیکی نانولوله های کربن بررسی شده توسط نانو پارتیکل سایزر DLS (a) تعداد، (b) شدت و (c) حجم پراکنده شده

Figure 2- Hydrodynamic diameter of carbon nanotubes investigated by DLS Nano-particle sizer  
a) Number, b) Intensity and c) Scattered volume

شکل ۳، حرکت ذرات (Mobility) و پتانسیل زتا نانولوله‌های کربنی چند دیواره را در غلظت ۱۰ نشان می‌دهد. ثابت دی الکتریک = ۷۹/۱۳، میانگین حرکت ذرات  $= -2.24 \mu\text{m/s/V/cm}$ ، میانگین زتا تا  $= -29.85 \text{ mV}$  می‌باشد.



شکل ۳- پتانسیل زتا و حرکت ذرات نانولوله‌های کربنی چند دیواره توسط دستگاه زتا سایزر برای غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر

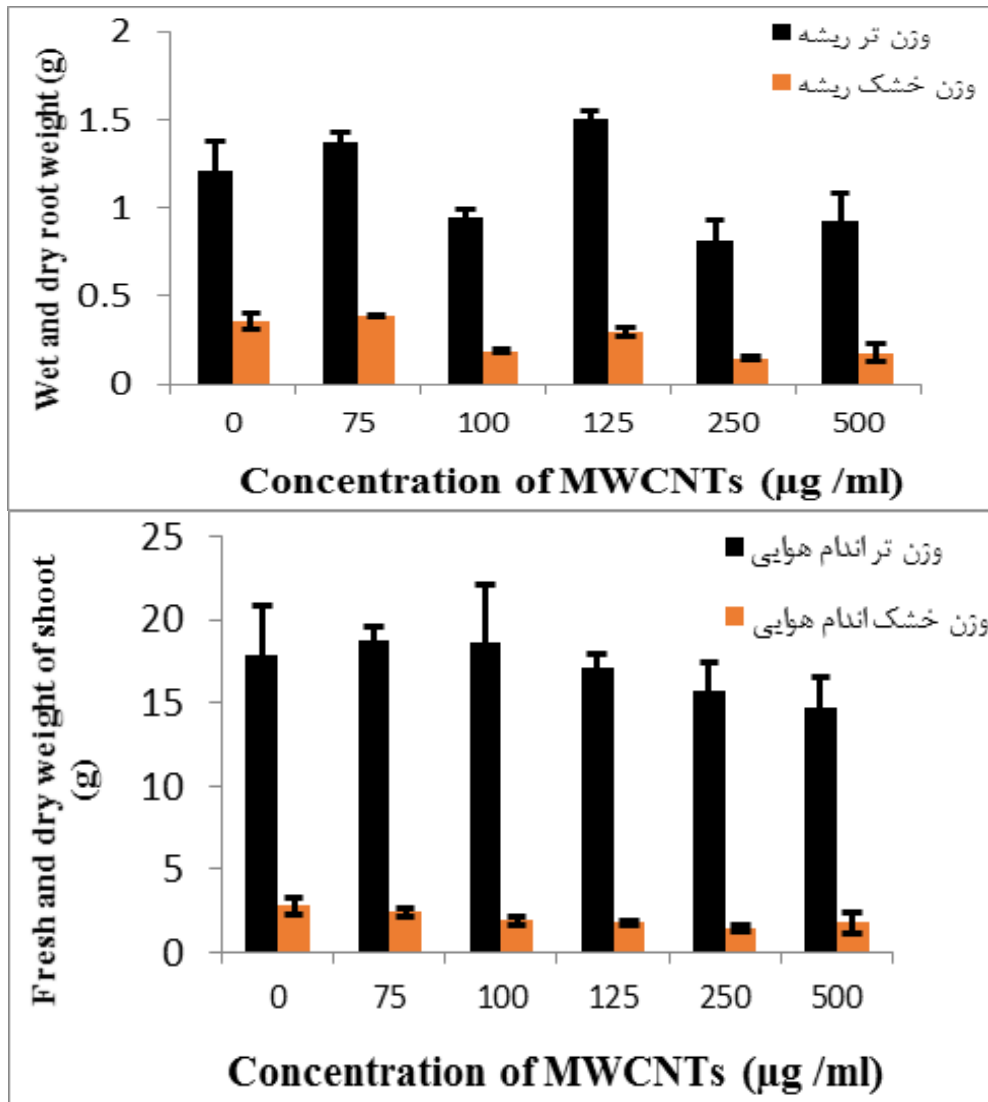
Figure 3- Zeta potential and particle motion of multi-walled carbon nanotubes by Zeta Sizer for concentration of 10  $\mu\text{g/ml}$

با توجه به شکل ۴، کلیه تیمارها به جز تیمارهای ۷۵، ۱۰۰ و ۱۲۵  $\mu\text{g/ml}$  نسبت به شاهد کاهش داشتند. بیشترین وزن تر ریشه، در تیمار ۱۲۵  $\mu\text{g/ml}$  و بیشترین وزن خشک ریشه و وزن تر اندام هوایی در تیمار ۷۵  $\mu\text{g/ml}$  که با تیمارهای ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰  $\mu\text{g/ml}$  دارای اختلاف معنی‌دار بود و کمترین وزن تر و خشک ریشه و خشک اندام هوایی در تیمار ۲۵۰  $\mu\text{g/ml}$  مشاهده شد که با شاهد و تیمارهای ۷۵ و ۱۲۵  $\mu\text{g/ml}$  اختلاف معنی‌دار داشت. بین تیمارهای ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰  $\mu\text{g/ml}$  با گروه شاهد، اختلاف معنی‌دار مشاهده شد.

9- Mobility Mean

10- Zeta Mean

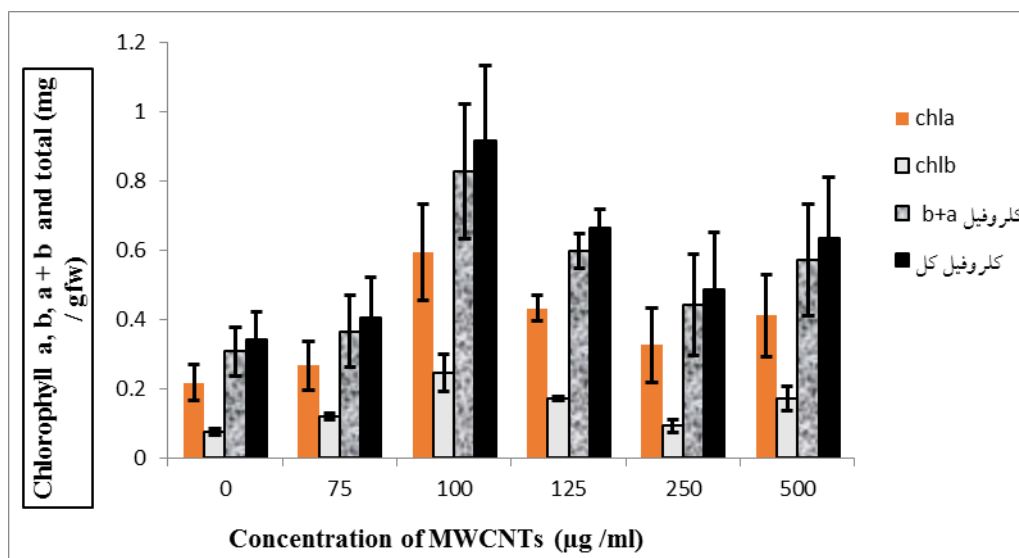
بیشترین وزن خشک اندام هوایی در شاهد و کمترین وزن تر اندام هوایی در تیمار ۵۰۰  $\mu\text{g/ml}$  مشاهده شد. بیشترین نسبت وزن تر به خشک ریشه و اندام هوایی، مربوط به تیمار ۲۵۰  $\mu\text{g/ml}$  و کمترین مربوط به شاهد و تیمار ۷۵  $\mu\text{g/ml}$  می‌باشد.



شکل ۴- تغییرات وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه گیاه کرچک در تیمارهای مختلف نانولوله‌های کربنی چندجداره  
 Figure 4- Changes of fresh and dry weight of shoot and root of castor plant in different treatments of multilayer carbon nanotubes  
 (Means in each column followed by similar letters are not significantly different at the %5 probability level)



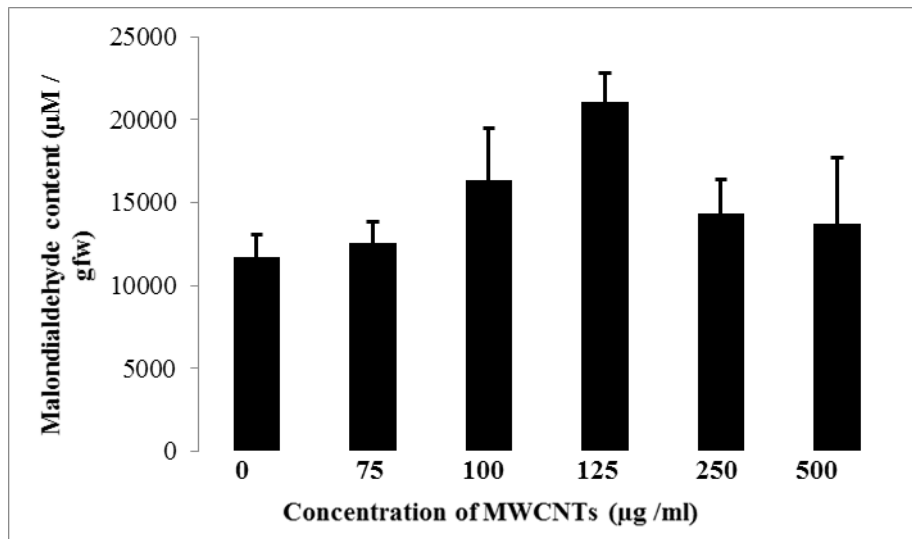
با توجه به شکل ۵، اثر تیمارهای مختلف نانولوله کربنی چند جداره بر میزان کلروفیل های گیاه کرچک در سطح احتمال ۵ درصد دارای اختلاف معنی دار بود. کلیه تیمارها، نسبت به شاهد افزایش داشتند. کمترین میزان کلروفیل a، b، a+b و کل در شاهد و بیشترین در تیمار ۱۰۰  $\mu\text{g/ml}$  مشاهده شد که از نظر آماری با گروه شاهد دارای اختلاف معنی دار بود. در کلیه موارد، بین تیمار ۱۰۰  $\mu\text{g/ml}$  با گروه شاهد و تیمار ۷۵  $\mu\text{g/ml}$  اختلاف معنی دار مشاهده شد.



شکل ۵- میزان کلروفیل a، b، a+b و کل گیاه کرچک در تیمارهای مختلف نانولوله های کربنی چندجداره  
 Figure 5- Content of content of a, b, a+ b and total Chlorophyll of castor plant in different treatments of multilayer carbon nanotubes  
 (Means in each column followed by similar letters are not significantly different at the %5 probability level)

با توجه به شکل ۶، اثر تیمارهای مختلف نانولوله کربنی چند جداره بر میزان مالون دی آلدئید گیاه کرچک در سطح احتمال ۵ درصد دارای اختلاف معنی دار بود. کمترین میزان مالون دی آلدئید در شاهد و بیشترین در تیمار ۱۲۵  $\mu\text{g/ml}$  مشاهده شد که از نظر آماری با گروه شاهد دارای اختلاف معنی دار بود. میانگین کل نسبت به شاهد افزایش داشت. بین تیمار ۱۲۵  $\mu\text{g/ml}$  با گروه شاهد و تیمارهای ۷۵، ۲۵۰ و ۵۰۰  $\mu\text{g/ml}$  اختلاف معنی دار مشاهده شد.

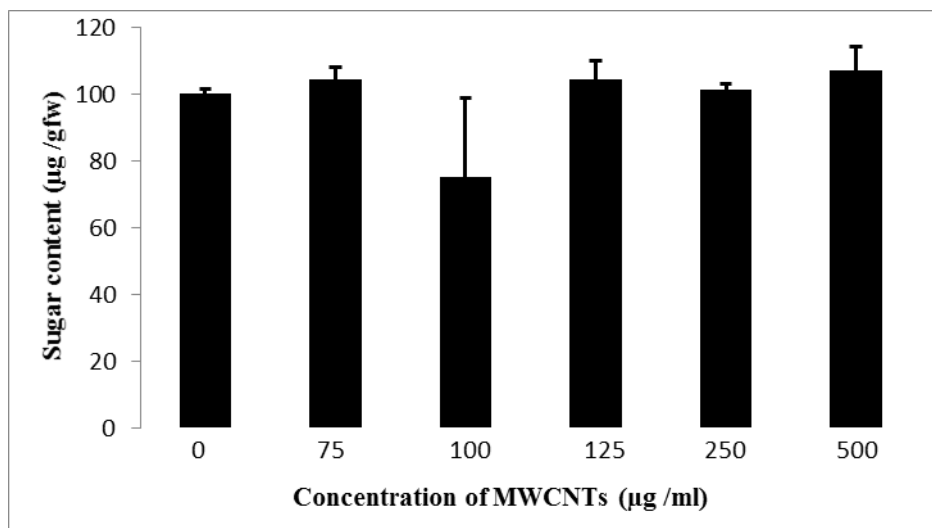
با توجه به شکل ۷، اثر تیمارهای مختلف نانولوله کربنی چند جداره بر میزان قند گیاه کرچک در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی دار نداشت. کلیه تیمارهای اعمال شده به جز تیمار ۱۰۰  $\mu\text{g/ml}$  موجب افزایش میزان قند برگ گیاه کرچک در مقایسه با گروه شاهد شدند. بیشترین میزان قند در تیمار ۵۰۰  $\mu\text{g/ml}$  و کمترین در تیمار ۱۰۰  $\mu\text{g/ml}$  مشاهده شد. میانگین کل نسبت به شاهد کاهش داشت.



شکل ۶- میزان مالون دی‌آلدئید گیاه کرچک در تیمارهای مختلف نانولوله‌های کربنی چندجداره

Figure 6- Malondialdehyde content of castor plant in different treatments of multilayer carbon nanotubes

(Means in each column followed by similar letters are not significantly different at the %5 probability level)



شکل ۷- میزان قند گیاه کرچک در تیمارهای مختلف نانولوله‌های کربنی چندجداره

Figure 7- Sugar content of castor plant in different treatments of multilayer carbon nanotubes

(Means in each column followed by similar letters are not significantly different at the %5 probability level)

## بحث

جهت تعیین اندازه نانولوله کربن از نانوپارتیکل سایزر استفاده شد. در این تحقیق بیشترین تعداد نانو لوله‌ها در محدوده ۳۵ تا ۳۰۰ نانومتر وجود داشتند. XRD فاز کریستالی نانو لوله را تعیین کرد. طبق نتایج XRD، یک فاز اصلی کربن تعیین شد. این نانوذره فاقد فاز فرعی بود.

اثر بازدارندگی نانولوله کربنی چند دیواره برای وزن تر و خشک ریشه و وزن خشک اندام هوایی در غلظت ۲۵۰  $\mu\text{g/ml}$  و برای وزن تر اندام هوایی در غلظت ۵۰۰  $\mu\text{g/ml}$  مشاهده شد. غلظت‌های بالای نانولوله کربنی، اثر بازدارندگی بر وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی داشتند. بیشترین وزن تر اندام هوایی و وزن خشک ریشه در تیمار ۷۵  $\mu\text{g/ml}$  و بیشترین وزن خشک اندام هوایی در شاهد و وزن تر ریشه در تیمار ۱۲۵  $\mu\text{g/ml}$  مشاهده شد. نانولوله‌های کربنی در غلظت‌های پایین می‌توانند بیان آکوآپورین‌ها را در جوانه‌های گوجه فرنگی رشد یافته در محیط آگار استریل حاوی نانولوله‌ها، فعال سازند. آکوآپورین‌ها، کانال‌های آبی و تنظیم کننده‌های مهم رشد و نمو گیاهان هستند. بنابراین افزایش بیان این نوع از کانال‌های آبی در گیاهان تحت تیمار نانولوله‌های کربنی یکی از علل افزایش وزن تر گیاه، رشد و بازده فتوسنتزی می‌باشد (Khodakovskaya et al., 2013). بیان چند ژن از کانال‌های آبی در بذرها، برنج تحت تیمار نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم نیز افزایش یافت (Kole et al., 2013). تیمار نانولوله‌های کربنی چند دیواره، وزن خشک و مقدار کلروفیل سلول‌های آرابیدوپسیس تحت تیمار را کاهش داد (Lin et al., 2009). اثرات مثبت نانولوله‌های کربنی در غلظت‌های کم و اثرات ممانعتی در غلظت‌های بالا، بدلیل افزایش بیان ژن آکوآپورین‌ها، افزایش تنفس خاک و فعالیت‌های متابولیک می‌باشد که به دنبال آن رشد و بیومس گیاه افزایش می‌یابد.

غلظت‌های مختلف نانوذره MWCNT، باعث افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی نسبت به شاهد شد. طبق نظر آندرسون و همکاران افزایش میزان کلروفیل دلیلی بر فعال بودن سلول‌ها و افزایش تولید مواد قندی آن‌ها است و افزایش مواد قندی از طریق تنظیم تنفس و فشار اسمزی موجب کاهش پیری گل‌ها می‌شود. به نظر می‌رسد افزایش میزان کلروفیل با جذب نانو لوله‌های کربنی از طریق افزایش فعالیت سلولی بوده است (Andersen et al., 2004). افزایش میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی در گیاهان تحت تیمار نانوذرات، همسو با نتایج حاصل از پژوهش حاضر است. غلظت کلروفیل برگ‌ها، یکی از عوامل کلیدی در تعیین سرعت فتوسنتز و تولید ماده خشک می‌باشد. در این پژوهش هماهنگی با افزایش فتوسنتز و میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی، در غلظت‌های کم نانولوله کربنی (۷۵  $\mu\text{g/ml}$ )، رشد و بیومس گیاه نیز افزایش یافت.

بررسی‌های انجام شده در این تحقیق نیز نشان داد که با افزایش غلظت نانولوله کربن، مقدار مالون دی‌آلدئید بعنوان شاخص پراکسیداسیون لیپید در برگ افزایش می‌یابد. افزایش مالون دی‌آلدئید در غلظت ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانولوله کربن نسبت به شاهد بیشتر است که این تغییرات احتمالاً بدلیل اثرات سمی نانولوله کربن می‌باشد. غلظت‌های مختلف نانوذره MWCNT، باعث افزایش مالون دی‌آلدئید شد. احتمالاً این سمیت با ایجاد رادیکال‌های آزاد واکنش‌پذیر، باعث پراکسیداسیون اسیدهای چرب شده و مالون دی‌آلدئید افزایش می‌یابد. تولید انواع گونه‌های اکسیژن تحت تنش‌های متعدد، غشای سلولی را دپلاریزه کرده و لیپیدهای موجود در غشای سلول پراکسید می‌شوند. در نتیجه پراکسیداسیون لیپیدهای غشا، روی ساختار غشا و انتقال مواد اثر می‌گذارد. افزایش

نفوذپذیری غشاء، باعث تخریب غشا و منجر به مرگ سلول می‌شود (Singh Gill and Tuteja, 2010). سمیت نانولوله‌های کربن و تولید انواع گونه‌های اکسیژن فعال، در سلول‌های تحت تیمار این نوع نانوذرات گزارش شده است (Kumar *et al.*, 2012). تأثیر نانولوله‌های کربنی چند دیواره‌ای اکسید شده روی نوعی جلبک به نام *Dunaliella tertiolecta* بررسی شده که تولید انواع گونه‌های اکسیژن فعال و آسیب اجزای سلولی مشاهده شد (Wei *et al.*, 2010). اثرات سمی نانولوله‌های کربنی چند دیواره روی سلول‌های سوسپانسیون برنج مورد بررسی قرار گرفته و افزایش انواع گونه‌های اکسیژن فعال و کاهش قدرت احیای سلول‌ها مشاهده شد (Tan *et al.*, 2009). رادیکال‌های آزاد درون سلول موجب آسیب رساندن به لیپیدها و اسیدهای چرب غشایی شده و رادیکال لیپید و پراکسی تولید می‌کنند. مالون دی‌آلدئید به عنوان شاخصی مناسب برای استرس‌های اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی محسوب می‌شود (Jiang and Huang, 2001)، که غلظت آن در پاسخ به استرس‌های زنده و غیرزنده متفاوت است و جهش‌زا می‌باشد. در حلال‌های آلی به شکل سیس و در آب ایزومر ترانس غالب می‌باشد. MDA یک ترکیب بسیار واکنش‌پذیر می‌باشد. تولید مالون دی‌آلدئید حاصل از پراکسیداسیون لیپیدها، در بسیاری از گیاهان تحت تنش انواع نانو ذرات مختلف گزارش شده است (Saison *et al.*, 2010). گزارش شده است که با افزایش میزان پراکسیداسیون لیپید در گیاهان تحت تنش کادمیوم، فعالیت لیپوکسیژناز افزایش می‌یابد (Sanita di Toppi and Gabbrielli, 1999). این آنزیم اکسیژناسیون اسیدهای چرب غیراشباع و با زنجیره طولانی که حاوی یک سیس را کاتالیز می‌کند. لینولئیک اسید و لینولنیک اسید بیشترین اسیدهای چرب غیراشباع در ساختمان سلول گیاهی هستند که سوبسترای ایده‌آلی برای این آنزیم می‌باشد (Skorzynska-Polit and Krupa, 2003). با توجه به نتایج حاصل از تحقیق حاضر، غلظت‌های بالای نانولوله‌های کربنی برای گیاه کرچک سمی بوده و باعث افزایش پراکسیداسیون لیپیدها و کاهش رشد شد. غلظت‌های مختلف نانوذره MWCNT به جزء ۱۰۰  $\mu\text{g/ml}$  باعث افزایش میزان قند شد. به دنبال کاهش میزان انتقال آب به برگ‌ها و تجمع نانولوله‌ها در سلول، میزان کربوهیدرات‌ها در برگ‌ها افزایش می‌یابد. در واقع افزایش قندها یک نوع مکانیسم تطابقی و سازگار یافته برای حفظ و نگهداری پتانسیل اسمزی تحت تنش آلومینیوم است. تجمع کربوهیدرات‌ها در حفظ غشای سلولی و تنظیم اسمزی موثر است (Prasad, 1995; Sato *et al.*, 2004). بسیاری از شرایط تنش‌زای محیطی بر متابولیسم قندها و پخش مواد فتوسنتزی در گیاهان در حال رشد اثر می‌گذارند. افزایش مقدار قندهای احیاء کننده تحت شرایط تنش شوری، غرقابی و سرما نیز گزارش شده است (Verma and Dubey, 2001) در این تحقیق میزان قند در کلیه تیمارها به جزء ۱۰۰  $\mu\text{g/ml}$  نسبت به شاهد افزایش داشت. علاوه بر نقش قندها در تنظیم فشار اسمزی تصور می‌شود با افزایش قندهای حل‌شونده گیاه بتواند ذخیره کربوهیدراتی خود را برای حفظ متابولیسم پایه سلول در شرایط محیطی تحت تنش در حد مطلوب نگه دارد (Verma and Dubey, 2001).

### نتیجه‌گیری

افزایش میزان کلروفیل با جذب نانو لوله‌های کربنی از طریق افزایش فعالیت سلولی بوده است (Andersen *et al.*, 2004). افزایش میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی در گیاهان تحت تیمار نانوذرات، همسو با نتایج حاصل از

پژوهش حاضر است. غلظت کلروفیل برگ‌ها، یکی از عوامل کلیدی در تعیین سرعت فتوسنتز و تولید ماده خشک می‌باشد. در این پژوهش هماهنگ با افزایش فتوسنتز و میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی، در غلظت‌های کم نانولوله کربنی (۷۵  $\mu\text{g/ml}$ ) رشد و بیومس گیاه (وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی) و میزان قند افزایش یافت. غلظت های بالای نانولوله‌های کربنی برای گیاه کرچک سمی بوده و باعث افزایش پراکسیداسیون لیپیدها و کاهش رشد شد که می‌توان از غلظت‌های کم نانولوله کربن برای افزایش میزان محصولات کشاورزی استفاده کرد.

#### منابع

- Andersen L., Williams M.H., Serek M. 2004. Reduced water availability improves drought tolerance of potted miniature roses: Is the ethylene pathway involved?. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 79 (1): 1-13.
- Aron D. 1949. Copper enzymes isolated chloroplasts, polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24: 1-15.
- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Fred S. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28 (3): 350-356.
- Flores D., Chacón R., Alvarado L., Schmidt A., Alvarado C., Chaves J. 2014. Effect of using two different types of carbon nanotubes for Blackberry (*Rubus adenotrichos*) in vitro plant rooting, growth and histology. *American Journal of Plant Sciences*, 5: 3510-3518.
- Jiang Y., Huang B. 2001. Drought and heat stress injury to two cool-season turf-grasses in relation to antioxidant metabolism and lipid peroxidation. *Crop Science*, 41: 436-442.
- Khodakovskaya M.V., Kim B.S., Kim J.N., Alimohammadi M., Dervishi E., Mustafa T., Cernigla C.E. 2013. Carbon nanotubes as plant growth regulators: effects on tomato growth, reproductive system, and soil microbial communit. *Small*, 9 (1): 115-123.
- Kole C., Kole P.H., Randunu K., Choudhary P., Podila R., Ke P., Rao A., Marcs R. 2013. Nanobiothechnology can boost crop production and quality: first evidence from increased plant biomass, fruit yield and phytomedicine content in bitter melon (*Momordica charantia*). *BMC Biotechnology*, 13: 37-45.
- Kumar V., Kumari A., Guleria P., Kumar Yadav S. 2012. Evaluating the oxicity of selected types of nano-chemicals. *Review of Environmental Contamination and Toxicology*, Doi: 10.1007/978-1-4614-1463-62.
- Lin C., Fugetsu B., Su Y., Watari F. 2009. Studies on toxicity of multi-wall carbon nanotubes on Arabidopsis T87 suspension cells. *Journal of Hazardous Materials*, 170: 578-583.
- Lin D., Xing B. 2007. Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. *Environmental Pollution*, 150: 243-250.
- Mani U., Dhanasingh S., Arunachalam R., Paul E., Shanmugam P., Rose C., Baran Mandal A. 2013. A simple and green method for the synthesis of silver nanoparticles using *Ricinus communis* leaf extract. *Progress in Nanotechnology and Nanomaterials*, 2 (1): 21-25.
- Metwally A., Finkemeier I., Georgi M., Dietz K.J. 2003. Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedling. *Plant Physiology*, 133: 272-281.

- Morteza E., Moaveni P., Aliabadi Farahani H., Kiyani M. 2013. Study of photosynthetic pigments changes of maize (*Zea mays* L.) under nano TiO<sub>2</sub> spraying at various growth stages. Springer Plus, 2: 247.
- Nel A., Xia T., Meng H., Wang X., Lin S., Ji Z., Zhang H. 2013. Nanomaterial toxicity testing in the 21st century: Use of a predictive toxicological approach and high-throughput screening. Accounts of Chemical Research, 46: 607-621.
- Poonam S., Kaur H., Geetika S. 2013. Effect of jasmonic acid on photosynthetic pigments and stress markers in *Cajanus cajan* (L.) mill sp. seedlings under copper stress, American Journal of Plant Sciences, 4: 817-823
- Prabhu N., Divya T.R., YamunaGowri K., Ayisha Siddiqua S., Joseph Puspha D. 2010. Silver phyto nanoparticles and their antibacterial efficacy. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, 5: 185-189.
- Prakash E., Gupta D.K. 2014. In vitro study of extracts of *Ricinus communis* Linn on human cancer cell lines. Journal of Medical Sciences and Public Health, 2 (1): 15-20.
- Prasad M. 1995. Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. Environmental and Experimental Botany, 35 (4): 525-45.
- Saison C., Perreault F., Daigle J.C., Fortin C., Clavierie Morin M., Popovic R. 2010. Effect of core-shell copper oxide nanoparticles on cell culture morphology and photosynthesis (photosystem II energy distribution) in the alga. Aquatic Toxicology, 96: 109-114.
- Sanita di Toppi L., Gabbrielli R. 1999. Response to cadmium in higher plants. Environmental and Experimental Botany, 41 (2): 105-130.
- Sato F., Yoshioka H., Fujiwara T., Higashio H. 2004. Physiological responses of cabbage plug seedlings to water stress during low-temperature storage in darkness. Scientia Horticulturae, 101 (4): 349-57.
- Singh A., Jain D., Upadhyay M.K., Khandelwal A., Verma H.N. 2010. Green synthesis of silver nanoparticles using *Argemone mexicana* leaf extracts and evaluation of their antimicrobial activities. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, 5: 483-489.
- Singh Gill S., Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry, 48: 909-930.
- Skorzynska-Polit E.W.A., Krupa Z. 2003. The activity of lipoxygenase in (*Arabidopsis Thaliana* L.) Heynh – a Preliminary study. Cellular and Molecular Biology, 8: 279-284.
- Sunkar R. 2010. MicroRNAs with macro-effects on plant stress responses. Semin Cell Dev Biological, 21: 805-811.
- Tan X-M., Lin C., Fugestu B. 2009. Studies on toxicity of multi-walled carbon nanotubes on suspension rice cells. Carbon, 47: 3479-3478.
- Tiwari D.K., Dasgupta-Schubert N., Villasenõr Cendejas L.M., Villegas J., Carreto Montoya L., Borjas Garcı a. S.E. 2014. Interfacing carbon nanotubes (CNT) with plants: enhancement of growth, water and ionic nutrient uptake in maize (*Zea mays*) and implications for nanoagriculture. Applied Nanoscience, 4: 577-591.
- Velikova V., Edreva A. 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. Plant Science, 151 (1): 59-66.
- Verma S., Dubey R.S. 2001. Effect of cadmium on soluble sugars and enzymes of their metabolism in rice. Biologia Plantarum, 44 (1): 117-123.

- Wei L., Thakar M., Chen Y., Ntim S., Mitra S., Zhang X. 2010. Cytotoxicity effects of water dispersible oxidized multiwalled carbon nanotube on marine alga, *Dunaliella tertiolecta*. *Aquatic Toxicology*, 100: 194-201.
- Wu G.L., Du G.Z. 2008. Germination is related to seed mass in grasses (Poaceae) of the eastern Qinghai-Tibetan Plateau, China. *Nordic Journal of Botany*, 25: 361-365.
- Yuan H., Hu S.H., Huang P., Song H., Wang K., Ruan J., He R., Cui D. 2011. Single walled carbon nanotubes exhibit dual-phase regulation to exposed *Arabidopsis* mesophyll cells. *Nanoscale Research Letters*, 6: 44-52.
- Zhang L., Hong F.S., Lu S. P., Lu C. 2005. Effect of nano-TiO<sub>2</sub> on strength of naturally aged seeds and growth of Spinach. *Biological Trace Element Research*, 104: 83-91.