فنآوری تولیدات گیاهی/ جلد هیجدهم/ شمارهٔ اول/ بهار و تابستان ۹۷
DOI: 10.22084/ppt.2018.6849.1395

تأثیر نانوتیوب‌های کربن چندجداره و تنش شوری بر خصوصیات مورفولوژیکی و فیتوشیمیایی مرزه رشینگری در شرایط کشت درون شیشه‌ای

Effect of Multi-walled Carbon Nanotubes and Salinity Stress on Morphological and Phytochemical Characteristics of *Satureja rechingeri* Jamzad *In Vitro*

حسن اسماعیلی[۱]، جواد هادیان[۲*]، محمدحسین میرجلیلی[۳] و حسن رضادوست [۴]

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۱/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۴/۲۶

چکیده

به‌منظور بررسی تأثیر نانوتیوب‌های کربن چندجداره و تنش شوری بر گیاه دارویی مرزه رشینگری، آزمایشی براساس فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار در شرایط درون‌شیشه‌ای در آزمایشگاه بیوتکنولوژی پژوهشکده گیاهان دارویی دانشگاه شهید بهشتی در سال ۱۳۹۲ انجام شد. عامل اول غلظت‌های صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوتیوب کربن و عامل دوم غلظت‌های صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار نمک (کلرید سدیم) بود. تعداد ریشه و شاخه، طول ریشه و شاخه و وزن‌تر و خشک اندام هوایی و مقدار رزمارینیک اسید و کافئیک اسید اندازه‌گیری شد. با افزایش غلظت نمک از صفر تا ۲۰۰ میلی‌مولار، کاهش معناداری در میانگین وزن‌تر اندام هوایی، تعداد ریشه و شاخه، طول ریشه و شاخه گیاه مشاهده شد. در بین غلظت‌های مختلف نانوتیوب کربن، فقط غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر باعث افزایش معناداری در وزن خشک اندام هوایی گردید. نانوتیوب کربن تعداد و طول ریشه، تعداد شاخه و وزن‌تر اندام هوایی را تحت تنش شوری بهبود بخشید. با افزایش غلظت نمک، متابولیت‌های رزمارینیک اسید و کافئیک اسید افزایش یافتند. از طرف دیگر هنگامی‌که نانوتیوب‌ها به محیط‌کشت حاوی نمک اضافه گردیدند کاهش معناداری در مقدار رزمارینیک اسید و کافئیک اسید مشاهده شد که نشان داد نانوتیوب‌های کربنی باعث بهبود وضعیت تنش برای گیاه شدند و واکنش متابولیتی گیاه به تنش را کاهش دادند.

واژه‌های کلیدی: نانومواد، رزمارینیک اسید، خصوصیات رشد، اسیدهای فنلی

۱، ۲ و ۳. به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد و دانشیاران، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
۴. استادیار گروه فیتوشیمی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
*: نویسنده مسئول Email: javadhadian@gmail.com

این مقاله مستخرج از پایان نامه کارشناسی‌ارشد آقای حسن اسماعیلی می‌باشد و استاد راهنمای این پایان‌نامه آقای دکتر هادیان می‌باشند.

مقدمه

مرزه رشینگری با نام علمی *Satureja rechingeri* Jamzad یکی از گونه‌های مرزه انحصاری ایران است که در مناطق جنوب غربی ایران روی صخره‌های آهکی می‌روید. این گیاه دارای گل‌های غالباً زردرنگ، پرزهای کرکی سفید متراکم و پوشش متراکم از غدد در هر دو سطح برگ است. برگ‌ها به رنگ خاکستری، کرک آلود و قاشقی تا نیزه‌ای شکل می‌باشند. ارتفاع این گونه تا ۶۰ سانتی‌متر می‌رسد (*جمزاد*[1]، 1996). مرزه رشینگری سرشار از مواد فنلی آنتی‌اکسیدان ازجمله کاراکرول در اسانس و رزمارینیک اسید و مشتقات آن در عصاره می‌باشد (*هادیان*[2] و همکاران، 2014) و به همین دلیل از گونه‌های موردعلاقه صنایع دارویی بوده و کشت و تولید آن در نظام‌های کشاورزی ضروری می‌باشد.

تنش‌های محیطی، رشد و عملکرد گیاهان را تحت تأثیر قرار داده و اثرات آن‌ها در کاهش میزان محصولات کشاورزی قابل توجه است (*شائو*[3] و همکاران، 2008). کاهش پارامترهای رشدی، مقدار رنگدانه‌ها و سرعت فتوسنتز و افزایش پرولین در گیاه مرزه تابستانه تحت تنش شوری گزارش شده است (*نجفی* و همکاران، 2010). با افزایش سطح استرس آبی مقدار اسانس، کربوهیدرات کل و مقدار پرولین در گیاه سالویا (*Salvia officinalis*) افزایش یافت (*هنداوی* و *خالید*[4]، 2005). هم‌چنین تنش آبی باعث کاهش معناداری در وزن‌تر و خشک، عملکرد اسانس در گیاه نعناع ژاپنی گردید (*میرسا* و *استریواستاوا*[5]، 2000). پاسخ سریع گیاه به تنش شوری، کاهش سرعت رشد و کاهش گسترش سطح برگ است (*پاریدا* و *داس*[6]، 2005). افزایش متابولیت‌های ثانوی ازجمله ترکیبات فنلی که آنتی‌اکسیدان‌های نیرومندی در بافت‌های گیاهی تحت شرایط تنش می‌باشند گزارش شده است و این خاصیت به‌دلیل ساختار و گروه فنل این متابولیت‌ها می‌باشد (*الامیرا* و *کراکر*[7]، 2007).

نانوتیوب‌های کربن[8] نانومواد‌ی هستند که ویژگی‌های متفاوتی نسبت به کربن معمولی یا ذغال فعال دارند (*فیلیپ*[9] و همکاران، 2000). نانولوله‌های کربن می‌توانند بر بیان تعدادی از ژن‌هایی که برای اعمال سلولی ضروری هستند، تأثیر بگذارند. اثر نانولوله کربن بر بیان ژن کانال آب (NtPIP1) و تولید پروتئین مربوطه در سلول‌های گیاه تنباکو (*Nicutina tabacum*) ثابت شده است (*خداکوسکایا*[10] و همکاران، 2012). در گیاهان در معرض نانولوله‌های کربن پروتئین‌های مرتبط با کانال آب[11] که از اجزای اصلی در روابط آب-گیاه هستند، افزایش یافته و در نتیجه جذب آب توسط ریشه، طویل شدن سلول، تولیدمثل و فتوسنتز افزایش می‌یابد (*مائورل*[12]، 2007؛ *کالدنهوف* و *فیشر*[13]، 2006؛ *خداکوسکایا* و همکاران، 2009). نشان داده شده است که نانوتیوب‌های کربنی قابل حل در آب[14] سرعت رشد را در ریشه‌ها و شاخه‌های گیاه نخود (*Cicer arietinum*) افزایش می‌دهند (*تریپاتی*[15] و همکاران، 2011). هم‌چنین این نانوذرات قادر به افزایش رشد کالوس‌های تنباکو بودند (*خداکوسکایا* و همکاران، 2012).

بررسی اولیه نشان داد که گیاه مرزه رشینگری مقاومت خوبی به تنش شوری دارد، هرچند رشد آن در غلظت‌های بالای نمک تحت تأثیر قرار می‌گیرد (آریان، ۱۳۹۲). با توجه به اثرات پیچیده نانوتیوب‌های کربن بر رشد و متابولیسم گیاه، در این تحقیق تأثیر این نانومواد بر ویژگی‌های مورفولوژیکی و فیتوشیمیایی مرزه رشینگری در شرایط تنش شوری موردبررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

ضدعفونی ریزنمونه‌ها

شاخساره‌های جدا شده از یکی از کلون‌های مرزه رشینگری (کشت‌شده در منطقه کشکان استان لرستان) ابتدا با آب جاری به‌مدت ۱۵ دقیقه شسته، سپس سه‌بار با آب‌مقطر آبکشی گردیدند. سپس نمونه‌ها ابتدا با اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۳۰ ثانیه ضدعفونی و با آب‌مقطر استریل آبکشی شدند. بلافاصله پس از این مرحله، آن‌ها در محلول هیپوکلریت سدیم ۳ درصد به‌مدت ۶ دقیقه غوطه‌ور و با آب‌مقطر استریل، سه مرتبه و هر بار به‌مدت ۳، ۵ و ۱۰ دقیقه آبکشی گردیدند.

مواد شیمیایی

استاندارد گالیک اسید، رزمارینیک اسید، کافئیک اسید، فولین و روتین از شرکت فلوکا[16] خریداری شد. حلال‌های، متانول با

1. Jamzad
2. Hadian
3. Shao
4. Hendawy and Khalid
5. Mirsa and Strivastava
6. Parida and Das
7. Al-Amira and Cracker
8. Carbon nanotube
9. Philip
10. Khodakovskaya
11. Aquaporins
12. Maurel
13. Kaldenholff and Fischer
14. Water soluble carbon nanotubes (wsCNTs)
15. Tripathi
16. Fluka

خلوص اچ‌پی‌ال‌سی از شرکت کالدون[1] کانادا، استون و فرمیک اسید با خلوص تجزیه‌ای از شرکت مرک و تولوئن از شرکت ایران کاوه خریداری شدند. صفحه سلیکاژلی TLC (TLC Silica gel 60 F254) و کلرید سدیم از شرکت مرک آلمان خریداری شد. هم‌چنین نانوتیوب‌های کربن با گروه عاملی کربوکسیل از شرکت نوترینو ایران خریداری گردید.

اعمال تیمار و سنجش‌های رشدی

آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار در آزمایشگاه بیوتکنولوژی پژوهشکده گیاهان دارویی دانشگاه شهید بهشتی در سال ۱۳۹۲ انجام شد. عامل اول غلظت‌های صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوتیوب کربن و عامل دوم غلظت‌های صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم و اثر متقابل این دو عامل موردبررسی قرار گرفت. پس از تهیه محیط‌کشت MS (*موراشیگ* و *اسکوگ*[2]، 1962) مقادیر مختلف نانوتیوب کربن و نمک به محیط‌کشت اضافه گردید و پس از تنظیم pH، اتوکلاو و توزیع شد. تعداد ۴ ریزنمونه با طول یکسان و با سه گره در داخل محیط‌کشت قرار گرفت. گیاهان به‌مدت یک ماه در اتاقک رشد (با میانگین دمای روزانه ۲۸، دمای شب ۲۴ درجه سانتی‌گراد و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) نگهداری شدند. پس از یک ماه تعداد ریشه و شاخه، طول ریشه و شاخه و وزن‌تر اندام هوایی اندازه‌گیری شد. سپس، گیاهچه‌ها به‌مدت ۴۸ ساعت در آون و دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و وزن‌خشک محاسبه گردید.

استخراج عصاره

از ۵۰۰ میلی‌گرم اندام هوایی خشک گیاه با ۱۰ سی‌سی متانول به‌مدت ۲۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک عصاره‌گیری شد و پس از سانتریفیوژ، عصاره به شیشه‌های تیره منتقل و تا زمان آنالیز در یخچال نگهداری شد.

اندازه‌گیری اسیدهای فنلی

جداسازی، شناسایی و اندازه‌گیری رزمارینیک اسید و کافئیک اسید با استفاده از سیستم کروماتوگرافی لایه نازک با کارآیی بالا[3] (HPTLC) و به روش پیشنهادی *ریچ* و *اسکیبلی*[4] (2006) و مشابه با هادیان و همکاران (2014) انجام شد.

سنجش محتوی فنل[5] و فلاونوئید[6] کل

محتوی فنل کل براساس واکنشگر Ciocalteus Reagent Folin (FCR) تخمین زده شد. میزان فنل کل گیاه معادل گالیک اسید اندازه‌گیری شد (*اسلینکارد* و *سینگلتون*[7]، 1977). از واکنش‌گر کلرید آلومینیوم ($AlCl_3$) برای سنجش فلاونوئیدها استفاده شد. از ترکیب فلاونوئیدی روتین برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد (*ژیشن*[8] و همکاران، 1999).

تجزیه داده‌ها

تجزیه واریانس و مقایسه میانگین صفات مورد بررسی به‌وسیله نرم‌افزار SAS نسخه 9.1 انجام شد. نمودارها به‌وسیله نرم‌افزار EXCEL رسم شد.

نتایج و بحث

بررسی خصوصیات مورفولوژیکی

تجزیه واریانس صفات مختلف موردبررسی نشان داد که اثر شوری، نانوتیوب و اثرات متقابل آن‌ها بر صفات طول، تعداد و وزن‌تر ریشه هم‌چنین طول و تعداد شاخه و وزن‌تر اندام هوایی مرزه رشینگری در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). اثر شوری و نانوتیوب بر وزن‌خشک اندام هوایی به‌ترتیب در سطح یک درصد و پنج درصد معنی‌دار بود درحالی‌که اثر متقابل آن‌ها معنی‌دار نبود (جدول ۱).

با افزایش غلظت نانوتیوب کربن از صفر تا ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، افزایش معناداری در تعداد ریشه نسبت به شاهد مشاهده شد. هنگامی‌که از غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار نمک استفاده گردید، هیچ‌کدام از گیاهان ریشه ندادند و حتی غلظت‌های متفاوت نانوتیوب کربن همراه با غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار نمک نیز نتوانست باعث ریشه‌دهی گیاهان شود. در بین تمامی تیمارها غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوتیوب کربن بالاترین میانگین را در صفت تعداد شاخه نشان داد (شکل ۱).

در بین تمام تیمارها بالاترین مقدار طول ریشه (۲/۴۷ سانتی‌متر) در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوتیوب کربن مشاهده شد (شکل ۳). در غلظت ۵۰ میلی‌مولار نمک کاهش معناداری در این صفت نسبت به شاهد مشاهده شد ولی استفاده از غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوتیوب کربن طول ریشه را در این محیط افزایش داد. در غلظت ۵۰ میلی‌مولار نمک کاهش معناداری در طول شاخه مشاهده نشد

1. Caledon
2. Murashige and Skoog
2. High Performance Thin Layer Chromatography
4. Reich and Schibli
5. Total Phenolic Content
6. Total Flavonoid Content
7. Slinkard and Singleton
8. Zhishen

اما در غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار نمک این کاهش معنادار بود. بالاترین طول شاخه (۳/۰۹ سانتی‌متر) متعلق به غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوتیوب بود (شکل ۲). در غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار نمک، افزودن ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوتیوب کربن منجر به افزایش معناداری در طول شاخه نسبت به غلظت‌های پایین‌تر نانوتیوب در همین غلظت نمک شد (شکل ۲).

با کاربرد غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوتیوب کربن اختلاف معناداری در صفت وزن‌تر اندام هوایی در مقایسه با شاهد مشاهده نشد ولی غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوتیوب کربن اختلاف معناداری را در این صفت نشان دادند (شکل ۴). در غلظت ۵۰ میلی‌مولار نمک، تیمارهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوتیوب باعث افزایش معناداری در وزن‌تر اندام هوایی شدند (شکل ۴). این نتایج نشان می‌دهد که نانوتیوب‌های کربن از طریق مکانیزم‌هایی ازجمله افزایش جذب و انتقال آب در گیاهان تحت تنش شوری به این گیاهان تحت تنش کمک می‌کنند. افزایش غلظت نمک تا ۵۰ میلی‌مولار، کاهش معناداری را در وزن‌خشک اندام هوایی نشان نداد درحالی‌که با افزایش غلظت نمک از این مقدار کاهش قابل ملاحظه‌ای در وزن خشک اندام هوایی مشاهده شد. غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوتیوب کربن منجر به افزایش در وزن خشک اندام هوایی نشد ولی در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوتیوب افزایش معنادار داشته و در بین تمام تیمارها بیشترین مقدار (۵۴/۵ میلی‌گرم) بود. افزودن غلظت‌های متفاوت نانوتیوب کربن به محیط‌کشت حاوی غلظت‌های مختلف نمک باعث افزایش معنی‌دار وزن خشک اندام هوایی نگردید (شکل ۴).

جدول ۱: تجزیه واریانس اثر شوری، نانوتیوب کربن و اثر متقابل آن‌ها بر گیاهچه‌های مرزه رشینگری

Table 1: ANOVA of the effect of salinity, carbon nanotubes and their interactions on *Satureja rechingeri* seedlings

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean squares						
		طول ریشه Root length	تعداد ریشه Root number	وزن‌تر ریشه Root fresh weight	طول شاخه Shoot length	تعداد شاخه Shoot number	وزن‌تر اندام هوایی Aerial part fresh weight	وزن‌خشک اندام هوایی Aerial part dry weight
تکرار Repeat	3	0.03	0.08	0.04	0.02	0.04	83.41	21.26
نمک Salt	3	11.73**	19.17**	17.92**	8.63**	3.49**	22933.9**	1770.8**
نانوتیوب کربن Carbon nanotube	3	0.84**	0.09**	3.3**	0.26**	1.54**	3872.8**	47.2*
نمک × نانوتیوب کربن Salt × Nanotube	9	0.87**	1.5**	2.02**	0.43**	0.43**	410.3**	23.7
خطا Error	45	0.02	0.06	0.11	0.76	0.63	59.55	14.03

* و **: به‌ترتیب معنی‌داری در سطوح احتمال ۱٪ و ۵٪

**: Significant at ($P < 0.01$) and *: Significant at ($P < 0.05$, respectively

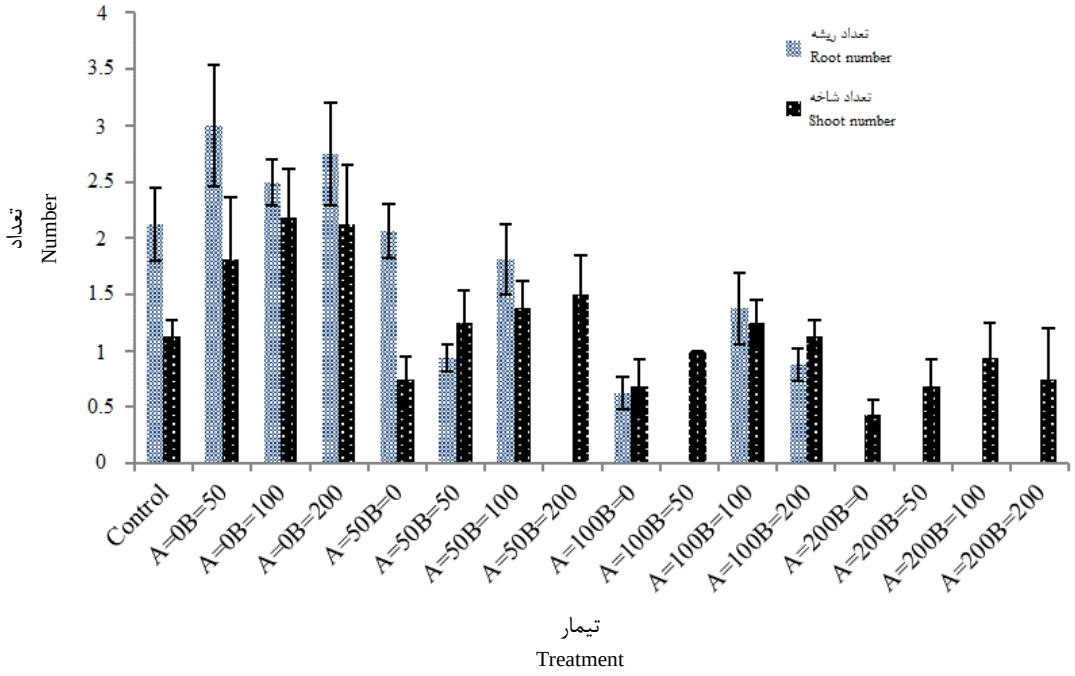
جدول ۲: تجزیه واریانس اثر شوری، نانوتیوب کربن و اثر متقابل آن‌ها بر خصوصیات فیتوشیمیایی مرزه رشینگری

Table 2: ANOVA of the effect of salinity, carbon nanotubes and their interactions on phytochemical characteristics of *Satureja rechingeri* seedlings

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean squares	
		مقدار رزمارینیک اسید Rosmarinic acid content	مقدار کافئیک اسید Caffeic acid content
تکرار Repeat	2	0.0003	0.00004
نمک Salt	3	0.0512**	0.007**
نانوتیوب کربن Carbon nanotube	3	0.0064**	0.003**
نمک × نانوتیوب کربن Salt × Nanotube	9	0.0082**	0.0119**
خطا Error	30	0.002**	0.0007**

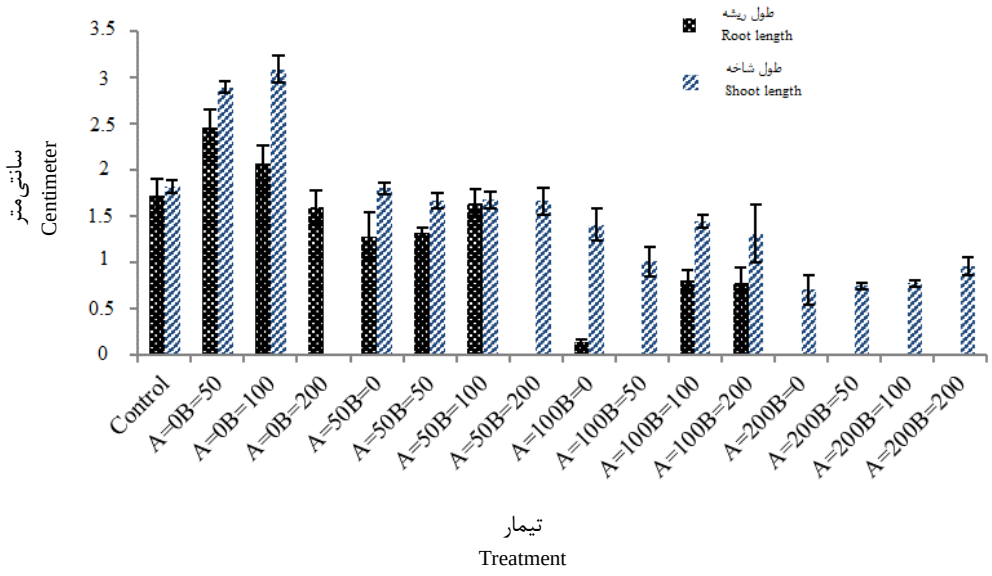
* و **: به‌ترتیب معنی‌داری در سطوح احتمال ۱٪ و ۵٪

**: Significant at (P < 0.01) and *: Significant at (P < 0.05, respectively



شکل ۱: تأثیر نانوتیوب‌کربن و شوری بر تعداد ریشه و شاخه مرزه رشینگری (نمک=A، نانوتیوب کربن=B)

Fig. 1: Effect of carbon nanotube and salinity on the number of roots and shoots of *S. rechingeri* (A = Salt, B = Carbon nanotube)

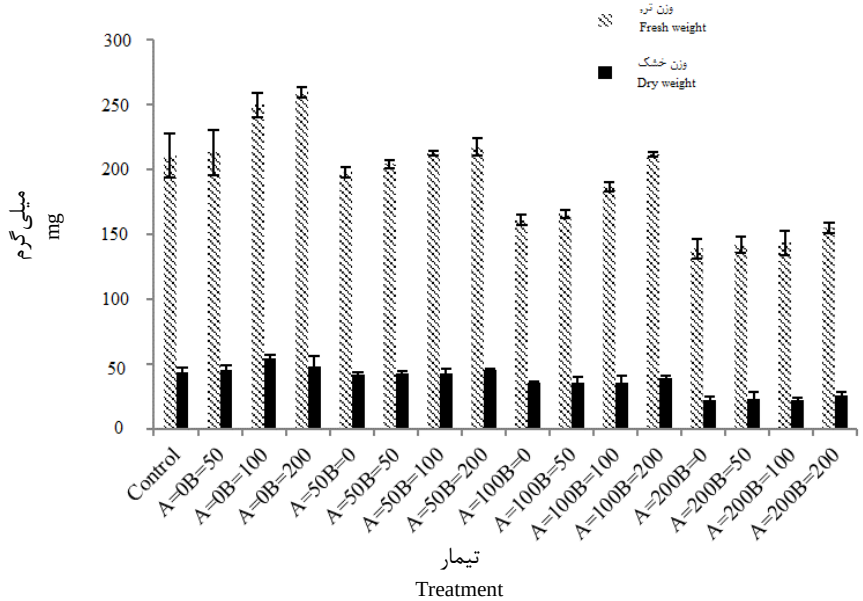


شکل ۲: تأثیر نانوتیوب‌کربن و شوری بر طول ریشه و شاخه مرزه رشینگری (نمک=A، نانوتیوب کربن=B)

Fig. 2: Effect of carbon nanotube and salinity on root and shoot length of *S. rechingeri* (A = Salt, B = Carbon nanotube)

شکل ۳: گیاهچه‌های مرزه رشینگری قرار گرفته در معرض نانوتیوب و نمک (نمک=A، نانوتیوب کربن=B)

Fig. 3: Seedlings of *S. rechingeri* exposed to nanotubes and salt (A = Salt, B = Carbon nanotube)

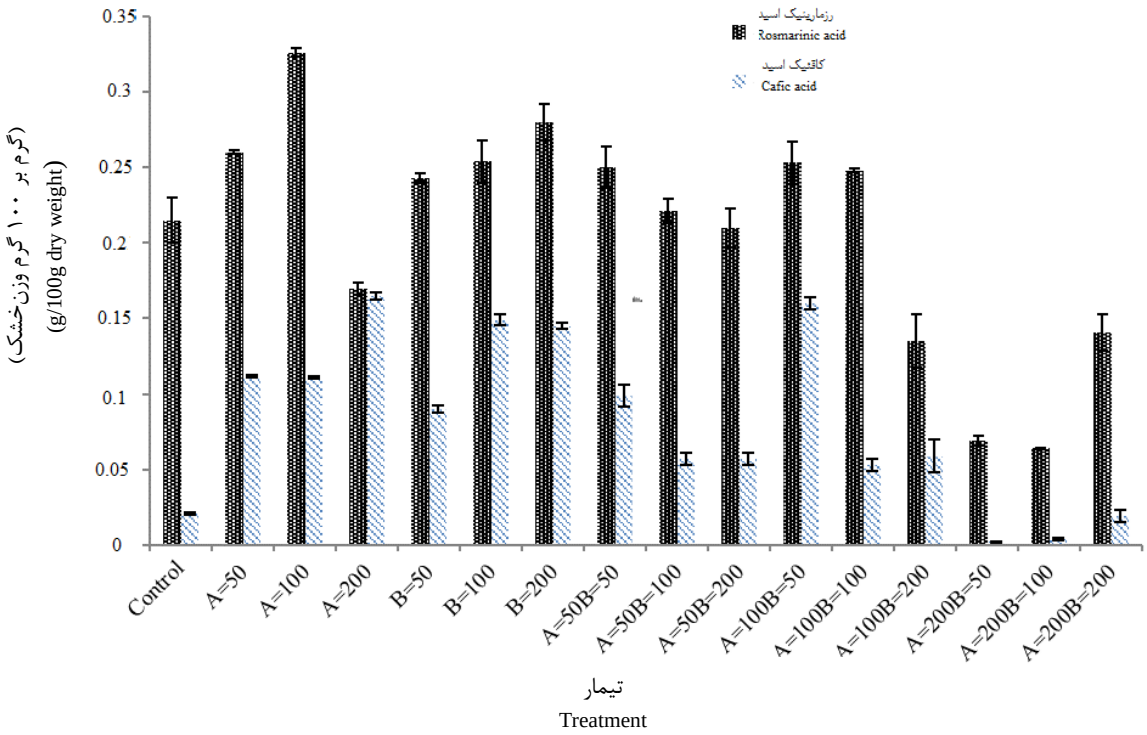


شکل ۴: تأثیر نانوتیوب‌کربن و شوری بر وزن‌تر و خشک اندام هوایی مرزه رشینگری (نمک=A، نانوتیوب کربن=B)

Fig. 4: Effect of carbon nanotube and salinity on fresh and dry weight of aerial parts of *S. rechingeri* (A = Salt, B = Carbon nanotube)

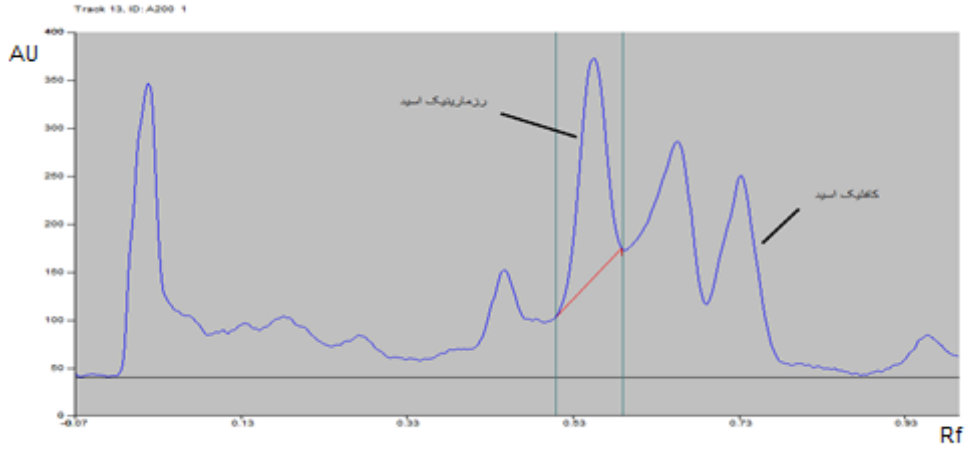
محمد[1] و همکاران (1998) گزارش کردند که افزایش غلظت شوری با کاهش معناداری در وزن شاخه، ارتفاع گیاه، تعداد برگ در هر گیاه، طول ریشه و سطح مقطع ریشه در گیاه گوجه فرنگی (*Solanum lycopersicum*) همراه است. همچنین ثابت شده است که افزایش سطح شوری باعث کاهش معناداری در رشد ریشه، شاخه، برگ و افزایش نسبت ریشه به شاخه در گیاه کتان می‌شود (*ملونی*[2] و همکاران، 2001). عارضه عمده تنش شوری همانند سایر عوامل تنش‌زا، کاهش رشد و عملکرد گیاهان می‌باشد. همان‌طور که در این آزمایش نیز مشاهده گردید، افزایش غلظت نمک از صفر تا ۲۰۰ میلی‌مولار نمک کاهش معناداری در میانگین وزن تر، تعداد ریشه، طول ریشه و شاخه و تعداد شاخه گیاه نشان داد. درباره تاثیر نانوتیوب‌های کربنی بر ویژگی‌های مورفولوژیک گیاهان اطلاعات اندکی موجود است. نشان داده شده است که نانوتیوب‌های کربنی قابل حل در آب[3] سرعت رشد را در ریشه‌ها و شاخه‌های گیاه نخود (*Cicer arietinum*) افزایش می‌دهند (*تریپاتی* و همکاران، 2011). همچنین این نانوذرات قادر به افزایش رشد کالوس‌های تنباکو بودند (*خداکوسکایا* و همکاران، 2012). در این آزمایش فقط غلظت۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر نانوتیوب کربن باعث افزایش معناداری در وزن خشک اندام هوایی گردید. غلظت‌های متفاوت نانوتیوب کربن(در دامنه ۵۰ تا ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در حضور غلظت‌های متفاوت نمک نتوانست افزایش معناداری را در وزن خشک باعث شود. این پدیده این احتمال را که نانوتیوب کربن به‌تنهایی از طریق مکانیسمی نامعلوم باعث افزایش رشد می‌شود تقویت می‌کند، اما در حضور نمک، نانوتیوب‌های کربنی باعث حفظ شرایط گیاه می‌شوند و کاهش در وزن خشک اندام هوایی در حضور نمک را تعدیل می‌کنند. غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوتیوب کربن باعث افزایش معناداری در وزن تر اندام هوایی نسبت به شاهد گردید که یک بار دیگر این نکته را تایید می‌کند که نانوتیوب‌های کربنی باعث جذب و نگهداری بیشتر آب توسط گیاه می‌شوند. در آزمایشی که *تریپاتی* و همکاران (2011) بر روی گیاه نخود انجام دادند نیز نتایج مشابه نشان داده شده بود چنان‌که نانوتیوب‌های کربن پس از اینکه جذب گیاه شدند با افزایش خاصیت موئینگی باعث افزایش جذب آب توسط گیاه شدند. نانوتیوب کربن اکسیده به‌طور معناداری طول سلول‌های ریشه را در گیاه گندم بهبود بخشید و با افزایش فعالیت هیدروژناز باعث رشد سریعتر ریشه و تولید زیتوده بیشتر گردید (*وانگ*[4] و همکاران، 2012) گزارش‌های بسیاری نشان می‌دهد که در گیاهانی که در معرض نانولوله‌های کربن قرار گرفته پروتئین‌های کانال آب بیشتری تولید می‌شود (*خداکوسکایا* و همکاران، 2011). براساس اطلاعات موجود مکانیسم اثر نانوتیوب کربن چند جداره بر روی طویل‌شدن سلول‌ها هنوز به‌طور کامل شناخته شده نیست. بنابراین مطالعه بیشتر در سطح سلولی نیاز است تا بتوان تعامل نانوتیوب‌ها و گیاهان را شناسایی کرد.

1. Mohammad
2. Meloni
3. Water Soluble Carbon Nanotubes (wsCNTs)
4. Wang



شکل ۵: مقایسه میانگین تأثیر نانوتیوب‌کربن و شوری بر مقدار رزمارینیک اسید و کافئیک اسید مرزه رشینگری (نمک =A، نانوتیوب کربن =B)

Fig. 5: Mean comparison of the effect of carbon nanotube and salinity on rosmarinic acid and cafeic acid content in *S. rechingeri* (A = Salt, B = Carbon nanotube)



شکل۶: کروماتوگرام HPTLC مربوط به مرزه رشینگری رشد یافته در غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار نمک (واحد قراردادی: AU، فاکتور بازداری: Rf)

Fig. 6: HPTLC chromatogram of *S. rechingeri* grown in salt concentration of 200mM (Rf: Retention factor, AU: Arbitrary units)

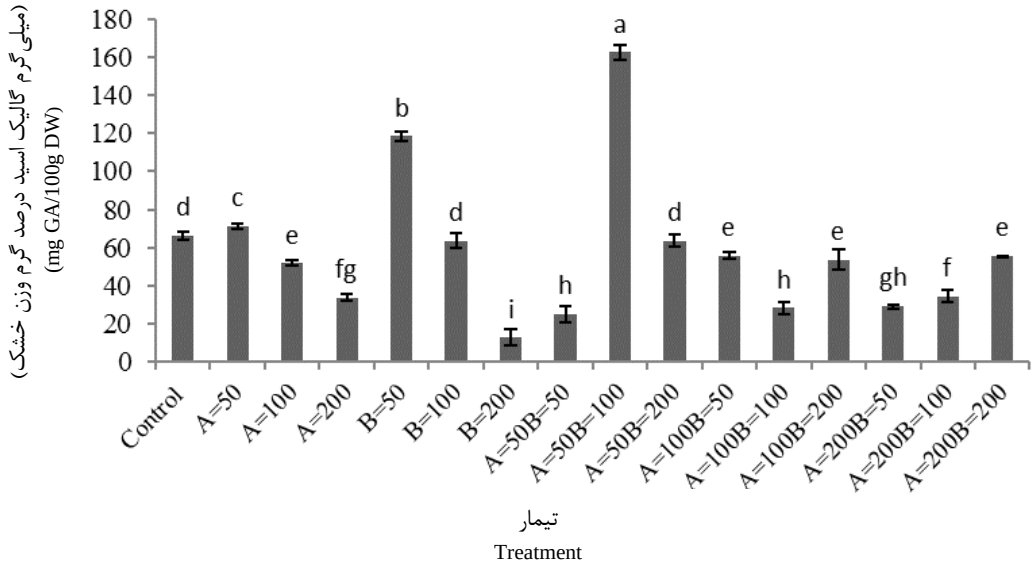
بررسی خصوصیات فیتوشیمیایی

مقدار رزمارینیک اسید و کافئیک اسید

تأثیر غلظت‌های مختلف نمک بر میزان رزمارینیک اسید معنی‌دار بود (جدول ۲). با افزایش غلظت نمک تا ۱۰۰ میلی‌مولار، مقدار رزمارینیک اسید افزایش یافت؛ اما در غلظت ۲۰۰ میلی مولار نمک مقدار رزمارینیک اسید به‌طور معناداری کاهش یافت (شکل ۶). با افزایش غلظت نانوتیوب کربن از صفر تا ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر افزایش معناداری در مقدار رزمارینیک اسید نسبت به شاهد مشاهده گردید. در همه غلظت‌های نمک، افزودن غلظت‌های متفاوت نانوتیوب کربن به محیط‌کشت باعث کاهش معناداری در مقدار رزمارینیک اسید گردید. افزودن نمک تا غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار به محیط‌کشت باعث افزایش معناداری در مقدار کافئیک اسید نسبت به شاهد گردید که این افزایش بین غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار نمک معنادار نبود. افزودن نانوتیوب کربن تا غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر باعث افزایش معناداری در مقدار کافئیک اسید گردید (شکل ۶). بیش‌ترین و کم‌ترین مقدار رزمارینیک اسید در تیمارهای ۱۰۰ میلی‌مولار نمک (۰/۳۲ گرم در صد گرم ماده خشک) و غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار نمک به همراه ۱۰۰ میگروگرم در لیتر نانوتیوب (۰/۰۶ گرم در صد گرم ماده خشک) و کافئیک اسید در تیمارهای ۲۰۰ میلی‌مولار نمک (۰/۱۷ گرم در ۱۰۰ گرم ماده خشک) و ۲۰۰ میلی‌مولار نمک به‌همراه ۵۰ میکروگرم در لیتر نانوتوب (۰/۰۱ گرم در صد گرم ماده خشک) مشاهده شد (شکل ۵).

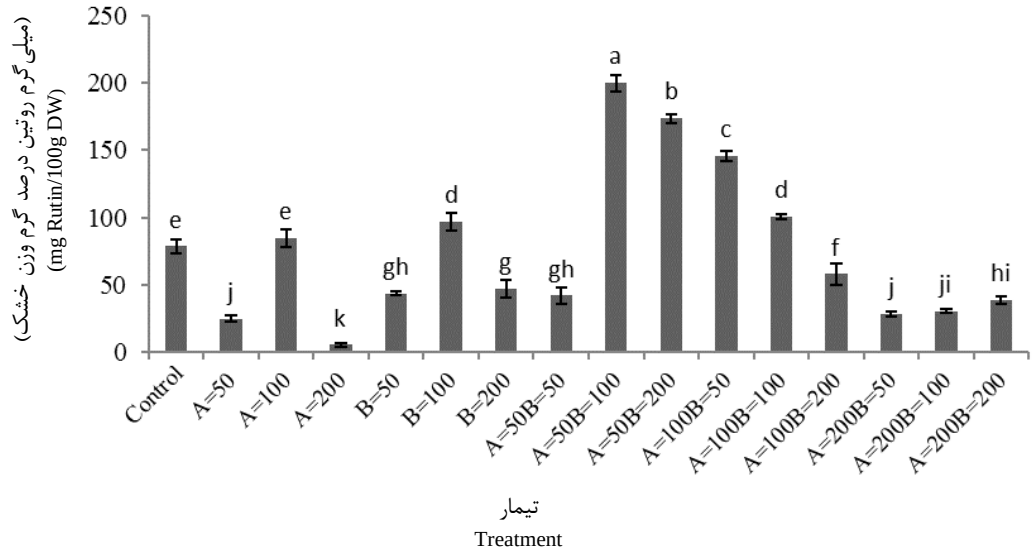
بررسی مقدار فنل و فلاونوئید کل

مقدار کل ترکیبات فنلی در غلظت ۵۰ میلی‌مولار نمک نسبت به شاهد افزایش معناداری را نشان داد، اما در غلظت‌های بالاتر نمک کاهش محسوس و معناداری در مقدار کل ترکیبات فنلی مشاهده گردید (شکل ۷). غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوتیوب کربن نیز باعث افزایش معنادار و غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر باعث کاهش معناداری در مقدار کل ترکیبات فنلی گردید در بین تیمارها، بیش‌ترین و کم‌ترین میزان فنل کل به‌ترتیب در تیمار۵۰ میلی‌مولار نمک به‌همراه ۱۰۰ میکروگرم در لیتر نانوتیوب و غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوتیوب مشاهده شد. مقدار کل ترکیبات فلاونوئیدی در غلظت ۵۰ میلی‌مولار نمک به همراه ۱۰۰ میکروگرم در لیتر نانوتیوب بیش‌ترین مقدار بود هم‌چنین کم‌ترین مقدار کل ترکیبات فلاونوئیدی مربوط به غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار نمک بود (شکل ۸).



شکل ۷: مقایسه میانگین تأثیر نانوتیوب‌کربن و شوری بر مقدار فنل کل مرزه رشینگری (نمک=A، نانوتیوب کربن=B). تیمارهای با حروف یکسان در سطح ۵٪ براساس آزمون LSD اختلاف معنادار ندارند

Fig. 7: Mean comparison of the effect of carbon nanotube and salinity on total of phenolic content of *Satureja rechingeri* (A = Salt, B = Carbon nanotube). Means followed by the same letter in the columns are not significantly different according to LSD test ($p<0.05$)



شکل ۸: مقایسه میانگین تأثیر نانوتیوب‌کربن و شوری بر مقدار فلاونوئید کل مرزه رشینگری (نمک=A، نانوتیوب کربن=B). تیمارهای با حروف یکسان در سطح ۵٪ براساس آزمون LSD اختلاف معنادار ندارند

Fig. 8: Mean comparison of the effect of carbon nanotube and salinity on total flavonoid content (A = Salt, B = Carbon nanotube). Means followed by the same letter in the columns are not significantly different according to LSD test ($p<0.05$)

در تنش شوری، غلظت ترکیبات فعال در گیاهان تحت تنش بیش از میزان آن در گیاهان کشت شده در شرایط استاندارد است. در مطالعاتی که بر روی گیاه جو صورت گرفت، شرایط تنش منجر به افزایش معناداری در میزان فلاونوئیدها شد. (*علی و عباس*[1]، 2013). در مطالعه‌ای که بر روی گیاه داتوره[2] صورت گرفته بود، افزایش غلظت نمک در گیاه منجر به تولید میزان بالایی از تروپان آلکالوئیدها شد (*براچت و کاسون*[3]، 1986). افزایش پرولین در گیاه مرزه تابستانه (*نجفی* و همکاران، 2010)، هم‌چنین افزایش پرولین، مقدار اسانس و کربوهیدرات در گیاه سالویا (*Salvia officinalis*)، کاهش عملکرد اسانس در گیاه نعناع ژاپنی[4] (*میرسا* و *استریواستاوا*، 2000). تحت تنش شوری گزارش شده است. هم‌چنین آریان (۱۳۹۲) بیان کرد که مقدار رزمارینیک اسید و کافئیک اسید در دو گونه مرزه خوزستانی و رشینگری تحت تنش شوری افزایش یافت. در این آزمایش با افزایش غلظت نمک متابولیت‌های رزمارینیک اسید و کافئیک اسید افزایش یافتند. در مورد تأثیر نانوتیوب‌های کربنی بر روی متابولیت‌های ثانویه گیاهی تاکنون گزارشی منتشر نشده است. با افزایش غلظت نانوتیوب در دامنه غلظتی صفر تا ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر هر دوی این متابولیت‌ها افزایش یافتند که از آن‌جایی‌که این نانوتیوب‌ها باعث بهبود خصوصیات مورفولوژیک گیاه شدند نمی‌توان آن‌ها را به‌عنوان مواد تنش‌زا به‌حساب آورد، احتمالاً این نانوتیوب‌ها از طریق مکانیسمی خاص به‌عنوان محرک[5] عمل کرده‌اند و باعث افزایش این متابولیت‌ها شده‌اند. از طرف دیگر هنگامی‌که نانوتیوب‌ها به محیط‌کشت حاوی نمک اضافه گردیدند کاهش معناداری در مقدار رزمارینیک اسید و کافئیک اسید مشاهده شد که نشان می‌دهد نانوتیوب‌های کربنی باعث بهبود وضعیت تنش برای گیاه شده‌اند و واکنش متابولیتی گیاه به تنش را کاهش داده‌اند.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این آزمایش نشان داد که نانوتیوب‌های کربنی باعث بهبود وضعیت گیاه در شرایط تنش شوری شدند، در واقع در شرایط تنش شوری یک نوع خشکی فیزیولوژیک برای گیاه به‌وجود می‌آید که اگر غلظت نمک از آستانه تحمل گیاه فراتر رود گیاه را دچار مشکل خواهد کرد و اگر این تنش شدید باشد باعث از بین رفتن گیاه خواهد شد. با اضافه کردن نانوتیوب کربن به محیط‌کشت گیاه، مقدار متابولیت‌های رزمارینیک اسید و کافئیک اسید افزایش یافتند و از طرف دیگر این نانوتیوب‌ها ویژگی‌های رشدی را در مرزه رشینگری تحت تنش شوری بهبود بخشیدند. بر این اساس، ممکن است نانوتیوب‌های کربن از طریق مکانیسمی نامعلوم هم به‌عنوان مهیج باعث افزایش متابولیت‌های ثانویه‌ای چون رزمارینیک اسید و کافئیک اسید

1. Ali and Abbas
2. *Datura inovia*
3. Brachet and Cosson
4. *Menta japonesa*
5. Elicitor

شده‌اند و هم به گیاه در شرایط شوری کمک کرده‌اند. هم‌چنین ثابت شده است که با توجه به نقشی که نانوتیوب‌های کربنی در جذب و انتقال آب در گیاه دارند می‌توانند به جذب آب توسط گیاه در شرایط تنش شوری کمک کنند.

منابع

آریان، ز. ۱۳۹۲. بررسی تأثیر تنش شوری بر رشد و نمو، عملکرد، مواد مؤثره و پارامترهای فیزیولوژیکی دو گونه مرزه *Satureja rechingeri* و *Satureja khuzistanica*. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد، دانشگاه تهران، ۱۵۴ صفحه.

Al-Amira, H. and Cracker, L. E. 2007. *In vitro* selection for stress tolerant spearmint. Issues in New Crops and New Uses, 306-310.

Ali, R. M. and Abbas, H. M. 2003. Response of salt stressed barley seedlings to phenyl urea. Plant Soil and Environment, 49 (4): 158-162.

Brachet, J. and Cosson, L. 1986. Changes in the total alkaloid content of *Datura innoxia* Mill subjected to salt stress. Journal of Experimental Botany, 37: 650-656.

Hadian, J., Esmaeili, H., Nadjafi, F. and Khadivi-Khub, A. 2014. Essential oil characterization of *Satureja rechingeri* in Iran. Industrial Crops and Products, 61: 403-409.

Hendawy, S. F. and Khalid, Kh. A. 2005. Response of sage (*Salvia officinalis* L.) plants to zinc application under different salinity levels. Journal of Applied Sciences Research, 1: 147-155.

Jamzad, Z. 1996. *Satureja rechingeri* (Labiatae) – a new species from Iran. Naturhistoriches Museum Wien, 98: 75-77.

Kaldenhoff, R. and Fischer, M. 2006. Aquaporins in Plants. Acta Physiologica, 187: 169-176.

Khodakovskaya, M., Dervishi, E., Mahmood, M., Xu, Y., Li, Z. R., Watanabe, F. and Biris A. S. 2009. Carbon nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth. ACS Nano, 3 (10): 3221-3227.

Khodakovskaya, M. V., De Silva, K., Biris A. S., Dervishi, E. and Villagarcia, H. 2012. Carbon nanotubes induce growth enhancement of tobacco cells. ACS Nano, 6 (3): 2128-35.

Maurel, C. 2007. Plant Aquaporins Novel Functions and Regulation Properties. FEBS Letters, 581: 2227-2236.

Meloni, D. A., Oliva, M. A., Martinez, C. A. and Cambraia, J. 2003. Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and gluthatione reductase in cotten under salt stress. Environmental and Experimental Botany, 49: 69-76.

Mirsa, A. and Strivastava, N. K. 2000. Influence of water stress on Japanese mint Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants, 7: 51-58.

Mohammad, M., Shibli, R., Ajlouni, M. and Nimri, L. 1998. Tomato root and shoot responses to salt stress under different levels of phosphorus nutrition. Journal of Plant Nutrition**,** 21 (8): 1667-1680.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. Plant Physiology, 15: 473.

Najafi, F., Khavari-Nejad, R. A. and Siah Ali, M. 2010. The Effects of Salt Stress on Certain Physiological Parameters in Summer Savory (*Satureja hortensis* L.) Plants. Journal of Stress Physiology and Biochemistry, 6: 13-21.

Parida, A. K. and Das, A. B. 2002. Effect of NaCl stress on nitrogen and phosphorous metabolism in a true mangrove *Bruguriera parviflora* grown under hydroponic culture. Journal of Plant Physiology, 161: 921-928.

Philip, G. C., Keith, B., Masa, I. and Zettl, A. 2000. Extreme oxygen sensitivity of electronic properties of carbon nanotubes. Science, 287 (5459): 1801-1804.

Reich, E. and Schibli, A. 2006. High-Performance Thin-Layer Chromatography for the Analysis of Medicinal Plants. Thieme Medical Publishers, New York, 197 pp.

Shao, H. B., Chu, L. Y. and Jaleel, C. A. 2008. Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. Comptes Rendus Biologies, 331 (3): 215-25.

Slinkard, K. and Singleton, V. L. 1977. Total phenol analysis: Automation and comparison with manual methods. American Journal of Enology and Viticulture, 28: 49-55.

Tripathi, S. H., Sonkar, S. K. and Sarkar, S. 2011. Growth stimulation of gram (*Cicer arietinum*) plant by water soluble carbon nanotubes. Nanoscale, 3 (3): 1176-1181.

Wang, X., Han, H., Liu, X., Gu, X., Chen, K. and Lu, D. 2012. Multi-walled carbon nanotubes can enhance root elongation of wheat (*Triticum aestivum*) plants. Journal of Nanoparticle Reserarch, 14: 841-851.

Zhishen, J., Mengcheng, T. and Jianming, W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chemistry, 64 (4): 555-559.

Effect of Multi-walled Carbon Nanotubes and Salinity Stress on Morphological and Phytochemical Characteristics of *Satureja rechingeri* Jamzad *In Vitro*

Esmaeili[1], H., Hadian[2*], J., Mirjalili[3], M. H. and Rezadoost[4], H.

Abstract

In order to evaluate the effect of multi-walled carbon nanotubes and salinity stress on morphological and phytochemical characteristics of *Satureja rechingeri*, a factorial experiment was conducted *in vitro* based on completely randomized design (CRD) with four replications. The first factor was the concentrations of 0, 50, 100 and 200µg/ml of carbon nanotubes and the second factor was the concentrations of 0, 50, 100 and 200mM NaCl. The number and length of shoots and roots, fresh and dry weight of the aerial parts, caffeic acid and rosmarinic acid content were evaluated. By increasing of NaCl concentration from 0 to 200mM, significant reduction in shoots fresh weight, root and shoot length and the number of shoots and roots was observed. Among different concentrations of carbon nanotubes, 100 µg/ml caused a significant increase in the aerial parts dry weight. Under salinity stress, carbon nanotubes improved the number and length of roots and the number and dry weight of shoots. By increasing of carbon nanotubes, caffeic acid and rosmarinic acid content were increased, while caffeic acid and rosmarinic acid content was significantly decreased under different NaCl concentrations. This finding shows carbon nanotubes alleviate the stress condition.

Keywords: Nanomaterials, Rosmarinic acid, Growth characteristics, Phenolic acids

1, 2 and 3. MSc Graduated Student and Associate Professors, Respectively, Department of Agriculture, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, G.C., Tehran, Iran

4. Assistant Professor, Department of Phytochemistry, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, G.C., Tehran, Iran

*: Corresponding author Email: javadhadian@gmail.com