

مقاله تحقیقی

تاثیر نانو لوله های کربنی چند جداره بر صفات جوانه زنی سه نوع گونه ی سوزنی برگ

فاطمه علی یاری^۱، مهرداد زرافشار*^۲، علی ستاریان^۳، سید کاظم بردبار^۲

۱. دانشجوی مقطع دکتری، دانشگاه شهر کرد، دانشکده کشاورزی.
۲. استادیار پژوهش، بخش تحقیقات منابع طبیعی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی فارس، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، فارس، ایران.
۳. دانشیار گروه جنگلداری، دانشگاه گنبد کاووس.

*مسئول مکاتبات: آدرس الکترونیکی: mehrdadzarafshar@gmail.com

محل انجام تحقیق: دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تربیت مدرس

تاریخ دریافت: ۹۶/۱/۲۷

تاریخ پذیرش: ۹۶/۵/۱۵

چکیده

از میان نانو مواد کربنی؛ نانو لوله های کربنی تک جداره و چند جداره به دلیل اثرات مثبت در صفات جوانه زنی بذور بیشتر مورد توجه می باشد. در این پژوهش تاثیر پرایمینگ بذور بوسیله ی نانو لوله های کربن بر صفات جوانه زنی سه گونه ی سوزنی برگ سرو نقره ای، سرو خمره ای و کاج سیاه مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور بذور این گونه ها بصورت جداگانه به مدت ۲ ساعت در محلول با غلظت های ۰، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم در لیتر از نانو لوله های کربنی پرایم شدند و آزمایش جوانه زنی بر روی آنها صورت گرفت. طبق نتایج بدست آمده نانو مواد کربنی صفات جوانه زنی بذور هر سه گونه را تحت تاثیر قرار داد به طوری که سرو خمره ای و سرو نقره ای در تیمار با غلظت ۵۰۰ میلی گرم و کاج سیاه با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بیشتر از تیمار شاهد جوانه زنی داشتند. در هیچ کدام از گونه ها اثر سمیت بر روی جوانه زنی مشاهده نشد و همچنین با افزایش غلظت نیز افزایش چندانی بر صفات جوانه زنی دیده نشد؛ لذا در مطالعات برای صرفه جویی در هزینه ها بهتر است از غلظت های کمتر از ۵۰۰ میلی گرم در لیتر استفاده شود.

واژه های کلیدی: جوانه زنی، سرو خمره ای، سرو نقره ای، کاج سیاه، نانو لوله های کربنی.

مقدمه

در سطح مواد با ابعاد در حد اتم، مولکول و سوپر مولکول ها را نانو تکنولوژی می گویند.

یک نانومتر حدود 100000 برابر کوچکتر از قطر هر تار موی انسان یا ضخامت هر ورقه ی کاغذ است. اندازه ی کوچک این مواد به آنها اجازه می دهد که از لحاظ فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی خصوصیات ویژه و جدیدی را از خود نشان دهند و فرآیندها و اثرات متفاوتی نسبت به ذرات درشت دانه ایجاد نمایند (۵). این مواد به طور کلی در خالص سازی آب، پاک سازی آب های آلوده، بهبود و اصلاح

فناوری نانو ذاتا یک فناوری بین رشته ای بوده و از این رو بسیاری از نظریه پردازان علمی، آن را نوعی رویکرد جدید در علوم مختلف محسوب می نمایند (۱). این فناوری روز به روز توسعه و گسترش یافته و کاربردهای بسیار جالب و مفیدی برای آن تعریف می شود. انجمن ملی نانو بنیاد نانو تکنولوژی که یک نهاد دولتی در کشور آمریکا است واژه نانو تکنولوژی را چنین توصیف می کند: تحقیق و توسعه ی هدفمند برای درک، دست کاری و اندازه گیری های مورد نیاز

مورد بررسی قرار دادند. نتایج آنها نشان داد که نانو لوله‌های کربنی در غلظت‌های پایین می‌تواند جوانه‌زنی و رشد ریشه برنج را افزایش دهد ولی در غلظت‌های بالا اثرات سمی دارد (۱۳). Yau و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند که نانو لوله‌های کربنی چند جداره در غلظت ۵۰ ug/ml باعث تحریک آرابیدوپیس و رشد سلول‌های مزوفیل در محیط کشت می‌شود (۱۴).

با وجود تحقیقات اخیر؛ فناوری نانو ذرات در کشاورزی بسیار جدید است و نیازمند اکتشافات و تحقیقات گسترده‌تری در این حوزه و همچنین شناخت عملکرد نانو ذرات در سطح مولکولی در سیستم‌های بیولوژیکی می‌باشد. با توجه به نتایج اثرات مثبت نانوکربن بر جوانه‌زنی بذر گیاهان در این تحقیق اثر این ماده در غلظت‌های مختلف بر درصد جوانه‌زنی بذر گونه‌های سرو خمره‌ای، سرو نقره‌ای و کاج سیاه مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی اثر نانو لوله‌های کربنی چند جداره بر مؤلفه‌های جوانه‌زنی بذر گونه‌های کاج سیاه، سرو نقره‌ای، سرو خمره‌ای آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تیمار و ۹ تکرار ۱۸ بذری در آزمایشگاه دانشگاه تربیت مدرس و مرکز بذر جنگلی خزر انجام شد. نانو ذرات خریداری شده (جدول ۱) به طور مستقیم در آب مقطر ریخته شده و با استفاده از دستگاه التراسونیک (۱۰۰ وات و ۹۰ کیلوهرتز) به مدت ۳۰ دقیقه، مخلوط یکنواخت نانو ذرات با غلظت‌های مختلف (۰، ۵۰، ۱۰۰، ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) ساخته شد.

صنعتی و خانگی، پزشکی و داروسازی، تولید محصولات کشاورزی و حفاظت محصولات و همچنین در حسگرهای هوشمند کاربرد دارند (۶). اولین کاربرد فناوری نانو در کشاورزی توسط وزارت کشاورزی آمریکا در سال ۲۰۰۳ انتشار یافت (۷). نتایج آزمایشات گذشته نشان می‌دهد که نانو ذرات می‌توانند اثرات مثبت و منفی در گیاهان داشته باشند. پاسخ گیاهان به نانو ذرات بر حسب نوع گونه، مرحله رویشی، سنی و ماهیت نانو ذرات متفاوت می‌باشد (۸). نانو لوله‌های کربنی نیز یک گروه ناهمگن هستند (۹) که می‌توانند خصوصیات مورفولوژیک و فیزیولوژیک سلول‌های گیاهی را تغییر دهند (۲). یکی از موثرترین اثرات نانو لوله‌های کربنی روی گیاهان بالا بردن درصد و سرعت جوانه‌زنی بذر می‌باشد. استفاده از نانو لوله‌های کربنی می‌تواند باعث ایجاد رخنه در بذر شود و در نتیجه موجب تسهیل ورود آب و اکسیژن به درون بذرها می‌شود و همچنین این احتمال وجود دارد که نانو لوله‌های کربنی با تأثیر بر کانال‌های عبور آب در غشا و تنظیم عمل آن‌ها بتواند به ورود آب به درون سلول‌ها کمک کند.

برای اولین بار استفاده از نانو لوله‌های کربنی با تحقیق شروع شد (۱۰). آن‌ها گزارش کردند نانو لوله‌های کربن چند جداره (MWCNT) با نفوذ در بذر گوجه فرنگی باعث افزایش رشد و سرعت جوانه‌زنی می‌شود. تأثیر مثبت نانو لوله‌های چند جداره بر جوانه‌زنی و رشد ریشه گیاهان *Raphanus sativus* T, *Brassica napus*, *Lolium perenne*, *cucumis sativus*, *Zea mays* تایید گشته است (۱۱، ۱۲).

Jiang و همکاران (۲۰۱۲) اثر نانو لوله‌های کربنی (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ ug/ml) بر جوانه‌زنی و رشد ریشه گیاه برنج را

جدول ۱- ویژگی نانو لوله‌های کربنی مورد استفاده در آزمایش.

نانو ساختار	خلوص (%) ^۱	قطر بیرونی (نانومتر) ^۲	قطر درونی (نانومتر) ^۳	طول (میکرومتر) ^۴
MWNTs	>۹۸	۱۵-۵	۵-۳	۵۰

۱. برآورد با استفاده از TEM و TGA، ۲. برآورد با استفاده از HRTEM، ۳. برآورد با استفاده از HRTEM، ۴. برآورد با استفاده از TEM، MWNTs = نانو لوله‌های کربنی چند جداره؛ TGA = تجزیه و تحلیل حرارتی. HRTEM = میکروسکوپ الکترونیکی و TEM = میکروسکوپ الکترونیکی

داده شدند. جهت پرایم کردن بذر در محلول نانو ذرات با غلظت‌های مشخص شده غوطه ور شدند و به مدت ۲ ساعت روی شیکر قرار گرفتند. پس از آن، بذرها از محلول خارج

بذور به مدت یک دقیقه با قارچ کش بنومیل (دو در هزار) ضد عفونی شده و سپس برای از بین بردن مواد ضد عفونی کننده، به مدت سه دقیقه با آب مقطر شستشو

معیار جوانه زنی ظهور ریشه چه به اندازه دو میلی متر در گرفته شد. در انتها نیز درصد جوانه (**%Germination**)، میانگین زمان جوانه زنی (**MGT**) سرعت جوانه زنی (**GRI**) با استفاده از فرمول های محاسبه شدند:

$\frac{n}{(N \times 100)}$	درصد جوانه زنی
$\frac{\sum(n/t)}{\sum(t.n) / \sum n}$	سرعت جوانه زنی
	میانگین زمان جوانه زنی

n: تعداد جوانه زنی بذرها در طول دوره. N: تعداد کل بذرها کشت شده، t: مدت زمان لازم برای جوانه زنی

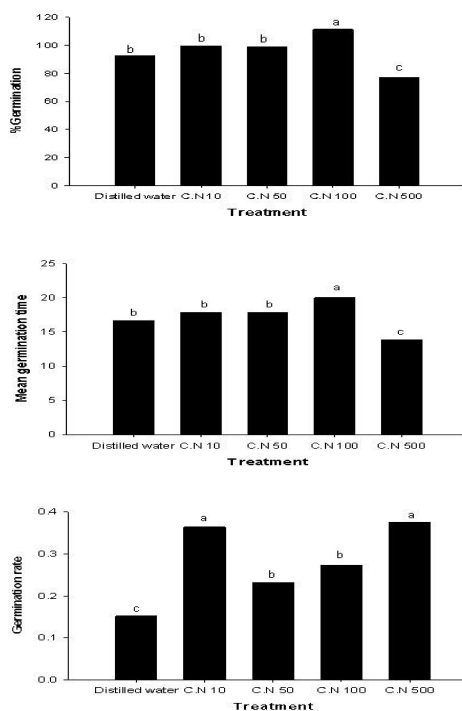
نتایج

تاثیر تیمارهای نانولوله کربن بر صفات جوانه زنی گونه

سرو نقره ای

نانولوله های کربنی صفات جوانه زنی بذر سرو نقره ای را تحت تاثیر قرار دادند به طوری که غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر بهترین درصد جوانه زنی را بدست داد. سرعت جوانه زنی

در تیمار ۱۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر به بیشترین مقدار رسیده است. کمترین مقدار میانگین زمان جوانه زنی تیمار ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر بدست آمد (شکل ۱). آنالیز واریانس نیز نشان می دهد تاثیر نانومواد کربنی صفات جوانه زنی (درصد جوانه زنی، سرعت جوانه زنی میانگین زمان جوانه زنی) بذر سرو نقره ای معنی دار (جدول ۲).



شکل ۱. تاثیر تیمار نانوکربن با غلظت های مختلف بر صفات جوانه زنی گونه ی سرو نقره ای. حروف مشترک لاتین نشان دهنده عدم تفاوت معنی دار در سطح 5% به وسیله آزمون چند دامنه دانکن می باشد.

جدول ۲. نتایج آنالیز واریانس شاخص‌های میانگین زمان جوانه‌زنی (MGT)، درصد جوانه‌زنی (%Germination) و سرعت جوانه‌زنی (GRI) گونه‌ی سرو نقره‌ای تحت تاثیر تیمار نانو کربن

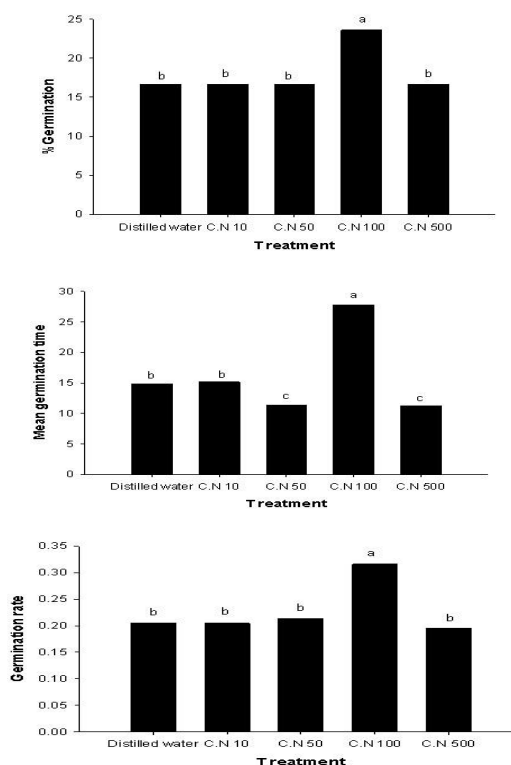
<i>Cupressus Arizona</i>		Ss	df	Ms	F-value	P-value
MGT	Treatment	81.71	4	20.43	1.025	0.042**
	Error	298.91	15	19.928		
	Total	380.635	19			
%Germination	Treatment	2522.199	4	630.55	1.025	0.036**
	Error	9225.78	15	615.053		
	Total	11747.98	19			
GRI	Treatment	0.140	4	0.035	1.219	0.034**
	Error	0.432	15	0.029		
	Total	0.572	19			

** معنی داری در سطح ۵٪ را نشان می‌دهد.

بر لیتر مشاهده شد. بیشترین درصد و سرعت جوانه‌زنی؛ در تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بدست آمد. نتایج آنا واریانس نشان می‌دهد اثر تیمار نانوموادکربنی بر میانگ. زمان جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی و درصد جوانه‌زنی سطح ۵٪ معنی‌دار شد (جدول ۳).

تاثیر تیمارهای نانولوله کربن بر صفات جوانه زنی گونه کاج سیاه

نتایج شکل ۲ نشان می‌دهد کمترین میانگین زمان جوانه‌زنی در تیمار نانوکربن با غلظت ۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم



شکل ۲. تاثیر تیمار نانوکربن با غلظت‌های مختلف بر صفات جوانه‌زنی گونه‌ی کاج سیاه. حروف مشترک لاتین نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار در سطح ۵٪ به‌وسیله آزمون چند دامنه دانکن می‌باشد

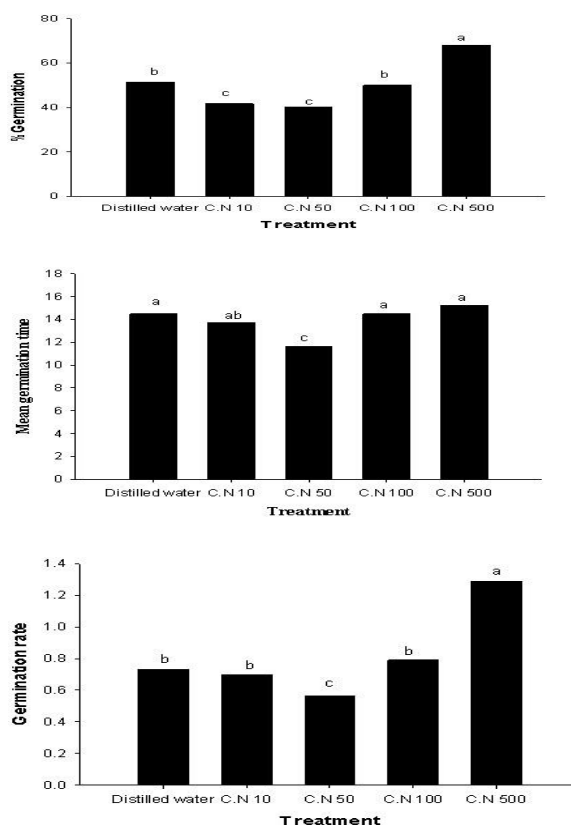
<i>Pinus nigra</i>		Ss	df	Ms	F-value	P-value
MGT	Treatment	739.232	4	184.80	1.047	0.0016**
	Error	2648.894	15	176.593		
	Total	3388.127	19			
%Germination	Treatment	154.32	4	38.580	0.194	0.038**
	Error	2986.11	15	199.074		
	Total	3140.432	19			
GRI	Treatment	0.040	4	0.010	0.343	0.045**
	Error	0.438	15	0.029		
	Total	0.478	19			

** معنی داری در سطح ۵٪ را نشان می‌دهد.

در تیمار ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کمترین میانگین زمان جوانه‌زنی را داشته است (شکل ۳). بر اساس نتایج آنالیز واریانس در سطح ۵٪ نانومواد کربنی تاثیر معنی‌داری بر صفات جوانه‌زنی گونه‌ی سرو خمره‌ای داشته است (جدول ۴).

تاثیر تیمارهای نانولوله کربن بر صفات جوانه‌زنی گونه سرو خمره‌ای

نتایج نشان داد که تیمار ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر از نانولوله‌های کربنی سبب افزایش درصد جوانه‌زنی و همچنین سرعت جوانه‌زنی گونه سرو خمره‌ای شده است. بذر این گونه



شکل ۳. تاثیر تیمار نانوکربن با غلظت‌های مختلف بر صفات جوانه‌زنی گونه‌ی سرو خمره‌ای. حروف مشترک لاتین نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار در سطح ۵٪ به‌وسیله آزمون چند دامنه دانکن می‌باشد.

جدول ۴. نتایج آنالیز واریانس شاخص‌های میانگین زمان جوانه‌زنی (MGT)، درصد جوانه‌زنی (%Germination) و سرعت جوانه‌زنی (GRI) گونه‌ی سرو خمره‌ای تحت تأثیر تیمار نانو کربن

<i>Cupressus sempervirence</i>	Ss	df	Ms	F-value	P-value	
MGT	Treatment	30.939	4	7.73	0.473	0.055**
	Error	245.28	15	16.35		
	Total	276.219	19			
%Germination	Treatment	1966.04	4	491.51	0.435	0.078**
	Error	16952.16	15	1130.144		
	Total	18918.210	19			
GRI	Treatment	1.018	4	0.254	0.731	0.058**
	Error	5.22	15	0.348		
	Total	6.23	19			

** معنی داری در سطح ۵٪ را نشان می‌دهد

بحث

جداره می‌توانند به‌عنوان کانال، مسیر عبور آب به درون سلول را فراهم آورده که این کار موجب رشد سریع‌تر و تقسیم سلول می‌شود (۱۰). نوروزی و همکاران (۱۳۹۱) اثر نانو لوله‌های کربنی چند جداره (۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) را بر شاخص‌های جوانه‌زنی و صفات مورفولوژیکی گیاه باقالا مورد بررسی قرار دادند نتایج نشان داد که صفات مورد اندازه‌گیری نسبت به غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر واکنش مثبت نشان داده و نسبت به سایر غلظت‌ها منفی بود (۴).

علی‌رغم تأثیر قابل‌قبول نانولوله‌های کربنی در رشد و جوانه‌زنی این گونه ولی باید استفاده از این نانوذرات با احتیاط صورت گیرد زیرا تقابل نانوذرات با سیستم‌های بیولوژیک بسیار پیچیده بوده و نیاز به تعمق بیشتری دارد و خطر سمیت در بافت‌های گیاهی وجود دارد (۱۷). حقیقی و عقیقی پور (۱۳۹۰) اثرات پرایمینگ بذر با نانولوله‌های کربنی را بر خصوصیات جوانه‌زنی بذر پیاز مورد بررسی قرار دادند. غلظت‌های مورد استفاده در این آزمایش (۰، ۱۰، ۲۰، ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر) بود. نتایج آن‌ها نشان داد که در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو خصوصیات جوانه‌زنی بذر پیاز بهبود یافت و غلظت ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر اثر سمیت دارد و موجب کاهش رشد می‌شود (۲). در تحقیق حاضر اثر سمیت بر روی جوانه‌زنی مشاهده نشد ولی از آنجایی که با افزایش غلظت نیز افزایش چندانی بر صفات جوانه‌زنی مشاهده نشد لذا بهتر است در مطالعات از غلظت‌های کمتر از ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر استفاده شود چرا که در هزینه‌ها نیز خواهد شد

بر اساس نتایج این تحقیق در گونه‌ی سرو نقره‌ای با افزایش غلظت نانولوله کربن در محلول پرایمینگ تا حدودی سرعت جوانه‌زنی افزایش یافت به‌طوری‌که در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به بیشترین مقدار خورد رسید و به تبعیت از آن میانگین زمان جوانه‌زنی نیز کاهش یافت. در گونه سرو خمره‌ای بنظر می‌رسد که درصد جوانه‌زنی و همچنین سرعت جوانه‌زنی در تیمار ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر از نانولوله کربن تا حدودی موفقیت آمیز بوده است. در گونه کاج سیاه نیز تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر سبب تغییرات اندکی در صفات جوانه‌زنی شده و سرعت جوانه‌زنی نیز در همین تیمار به حداکثر مقدار خود رسیده است. نتایج تحقیقات De La Torre-Roche و همکاران (۲۰۱۳) نیز نشان داد که تیمار نانو کربن‌های چند دیواره باعث افزایش درصد جوانه‌زنی و افزایش رشد در گونه‌های سویا (*Glycine max*)، جو (*Hordeum vulgare*) و ذرت (*Zea mays*) شد (۱۵). Khodakovskaya و همکاران (۲۰۱۲) اثر نانولوله کربنی چند جداره در غلظت ۵ تا ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر می‌تواند ۵۵ تا ۶۴ درصد سرعت رشد سلول‌های تنباکو را افزایش دهد این در حالی است که کربن فعال در غلظت ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر تنها ۱۶ درصد رشد سلول‌ها را افزایش داد. نتایج آن‌ها نشان داد بیان ژن NtPIPI و تولید پروتئین مربوط به این ژن افزایش شدیدی یافت و بیان ژن مربوط به تقسیم سلولی (Cycb) و رشد دیواره سلولی در بذر افزایش یافت (۱۶). تحقیقات دیگر این عمل را این‌گونه توجیه می‌کنند که نانولوله‌های کربنی چند

منابع مورد استفاده

۱. پوررحیم، ر، فرزادفر، ش، گلنراقی، ع، ۱۳۸۷. فناوری نانو و کشاورزی، نشر سپهر، تهران، ص ۲۱۳.
۲. حقیقی، م، عفیفی پور، ز، ۱۳۹۰. بررسی اثر پرایمینگ بذر با نانو لوله‌های کربنی، نانو تیتانیوم و نانو مس بر خصوصیات جوانه‌زنی پیاز. اولین کنگره ملی علوم و فناوری‌های نوین کشاورزی، زنجان، دانشگاه زنجان.
۳. احمدلو، ف، طبری، م، رحمانی، ا، یوسفزاده، ح، ۱۳۸۹. اثر تیمارهای کود دامی و خاک برگ بر بهبود M., Taran, F., Dive, V., Carrière, M., 2012. Quantitative evaluation of multi-walled carbon nanotube uptake in wheat and rapeseed. *Journal of Hazardous Materials* 227: 155-163.
13. Jiang, Y., Hua, Z., Zhao, Y., Liu, Q., Wang, F., Zhang, Q., 2012. The effect of carbon nanotubes on rice seed germination and root growth. *International Conference on Applied Biotechnology, Lecture Notes in Electrical Engineering* 250, Springer-Verlag, Berlin. pp 1207-1212.
14. Yuan, H. G., Hu, S.L., Huang, P., Song, H., Wang, K., Ruan, J., He, R., Cui, D. X., 2011. Single walled carbon nanotubes exhibit dualphase regulation to exposed Arabidopsis mesophyll cells. *Nanoscale Res Lett* 6(1): 44.
15. De La Torre-Roche, R., Hawthorne, J., Deng, Y., Xing, B., Cai, W., Newman, L. A., White, J. C., 2013. Multiwalled carbon nanotubes and C60 fullerenes differentially impact the accumulation of weathered pesticides in four agricultural plants. *Environmental science & technology* 47 (21): 12539-12547
16. Khodakovskaya, M., Kanishka, D. S., Alexandru, S. B., Dervishi, E., Villagarcia, H., 2012. Carbon nanotubes induce growth enhancement of tobacco cells. *ACS Nano* 6(3): 2128-2135.
17. Daohui, L., Baoshan, X., 2007. Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. *Environmental pollution (Barking, Essex: 1987)* 150(2): 243-50.
۴. نوروژی، س، تدین، م، نوروژی، م، ۳۹۱. نانوتیوب کربنی بر جوانه‌زنی و برخی مرفولوژیک گیاه باقلا. اولین همایش تنه گیاهی(غیر زیستی).
- onica, R. C., R. Cremonini. 2009. nanoparticles and higher plants. *Caryologia*. (2): 161.
- hot, L. R., Sindhuja, S., Maja, J. M., Ehsani, , Edmund, W. S., 2012. Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection a review. *Crop Protection* 35: 61-70.
- orman, S., Hongda, C. H., 2013. Nanoscale science and engineering for agriculture and food systems. *Industrial Biotechnology* 9(1): 17-18.
- air, R., Saino, H. V., Baiju, G. N., Maekawa, , Yoshida, Y., Sakthi Kumar, D., 2010. Nanoparticulate material delivery to plants. *Plant Science* 179(3): 154-163.
- ckson, P., Jacobsen, N. R., Baun, A., Birkedal, , Kühnel, D., Jensen, K. A., Vogel, U., Wallin, , 2013. Walled carbon nanotubes exhibit dual phase regulation to exposed Arabidopsis mesophyll cells. *Nanoscale Res Lett* 6(1): 44.
- hodakovskaya, M., Dervishi, E., Mohammad, ., Xu, Y., Li, Z., Watanabe, F., Biris, A. S., 2009. Carbon nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth. *Acs Nano* 3: 3211-3227.
- n, D., Xing, B., 2007. Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. *Environmental Pollution* 150: 243-250.
- amille. L., Pinault, M., Czarny, B., Georgin, ., Jaillard, D., Bendiab, N., Mayne-L'Hermitte,