

Investigation on the Effects of Carbon Nanotubes and Kinetin on Growth and Regeneration of *Salvia nemorosa* under *in vitro* Conditions

Abstract

Introduction

Today, the consumption of medicinal plants has increased significantly and a remarkable percentage of medicines are of plant origin. Therefore, the cultivation and production of medicinal plants can contribute to the health of the society and play a significant role in the economy of the society. *Salvia nemorosa* is an herbaceous, perennial, and medicinal plant. This valuable plant belongs to the *Labiatae* family. The aerial parts of the plant, especially the leaves, contain essential oils. Furthermore, *S. nemorosa* contains chemical compositions such as saponin, organic acids, diterpenes, triterpenes, polyphenols, and a bitter substance called picrosalvin. In the plant tissue culture, the preparation of culture medium and formulation compatible with the tissue of the tested plant is vital for efficient regeneration and plant growth. Generally, no specific culture medium can be recommended for the growth of explants, and is necessary to make changes in the culture medium in order to better respond to different types of explants. Carbon nanotubes are nanomaterials that can be added to the culture medium and increase the growth rate of different parts of the plant such as roots, stems, and branches. Cytokines also commonly participate in cell divisions and proliferate shoots by removing terminal dominance. Considering the mentioned importance, this study was conducted to investigate the effect of carbon nanotubes, kinetin, and their interactions on some morphophysiological and phytochemical properties of *S. nemorosa* under *in vitro* conditions.

Materials and Methods

This experiment was carried out in the tissue culture and biotechnology laboratory of the Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Mohagheh Ardabili. This study was conducted based on factorial design (completely randomized design) with five replications. The treatments included five levels of carbon nanotubes (0, 10, 20, 40, and 80 mg/L CNT) and three levels of kinetin (0, 2, and 4 mg/L CK). The seeds of *S. nemorosa* were sterilized with 70% ethanol for 40 seconds and then 2.5% hypochlorite sodium for 15 minutes (then the seed were washed with deionized water three times 3, 5, and 15 minutes). The sterilized seeds were planted in MS medium containing 30 g/L sucrose and 8 g/L agar, and then transferred to a growth chamber. After 40 days, the obtained seedlings were cut into single nodes by removing leaves and transferred to the main treatment medium. After that, some traits such as fresh weight, number of branches, number of leaves, number of roots, leaf area, root length, seedlings height, viability rate, germination rate, chlorophylls a, b, carotenoid content, phenol content, and flavonoid content were examined. The obtained data related to the experiment were analyzed with SAS software, the comparison of data means was done with Duncan's test, and the graphs were plotted using Excel software.

Results and Discussion

The results indicated that the interaction effect of carbon nanotubes and kinetin on the indices of fresh weight, number of branches, number of leaves, number of roots, leaf area, root length, seedling height, survival percentage, germination percentage, pigment content photosynthesis was not significant. On the contrary, the interaction effect of two treatments on the content of total flavonoid and total phenol showed a significant difference. The highest phenol content was obtained in the treatment combination of 80 mg/L of carbon nanotubes and 4 mg/L of kinetin. On the other hand, increasing the concentration of carbon nanotubes up to 80 mg/L, the average shoot production, number of leaves, leaf area, plant height, root number, root length, chlorophyll a, b, carotenoid, phenol and flavonoid content. increased significantly. Also, by increasing the concentration of kinetin (4 mg/liter), the number of branches, the content of chlorophyll a and b increased significantly.

Conclusions

The characteristics of the *S. nemorosa* plant, except for fresh weight, significantly increased under the influence of carbon nanotube treatments. However, under the influence of kinetin treatment, only the number of branches, chlorophyll a, b, phenol content, and flavonoid content showed a significant increase. Based on the results of this study, carbon nanotubes can be used for proliferation and increasing the secondary metabolites of *S. nemorosa*. Despite the results of this study, it is still possible to use higher concentrations of carbon nanotubes in future research in order to increase the phytochemical properties and productivity of other medicinal plants.

Keywords: Carbon nanotubes, Cytokinin, *Salvia nemorosa*, Tissue culture

بررسی تأثیر نانو لوله‌های کربن و کینتین بر رشد و باززایی مریم گلی تحت شرایط درون شیشه‌ای

یونس پوربیرامی هیر*؛ اسماعیل چمنی؛ مهسا احدزاده؛ شبنم شاکر؛ رقیه نبی پور سنجید

*- younes_ph62@uma.ac.ir

<https://doi.org/10.22067/jhs.2024.84810.1293>

چکیده

گونه *Salvia nemorosa* گیاهی دارویی، علفی و چندساله از خانواده نعناعیان است. نانولوله‌های کربن نوعی دگرشکلی^۱ از اتم‌های کربن هستند که به دلیل خاصیت آبدوستی موجب افزایش جذب آب و رشد قسمت‌های مختلف گیاهان می‌شوند. سایتوکینین‌ها نیز معمولاً در تقسیمات سلولی شرکت می‌کنند و با حذف غالبیت انتهایی باعث پرآوری شاخه‌ها می‌شوند. با توجه به اهمیت‌های ذکر شده، این پژوهش به منظور بررسی تأثیر نانو لوله‌های کربن، کینتین و همچنین اثرات متقابل آن‌ها بر خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی مریم گلی تحت شرایط درون شیشه‌ای انجام شد. بعد از کشت بذر در محیط کشت MS، گیاهان حاصل با حذف برگ‌ها به صورت تک گره برش داده شده و به محیط تیمار اصلی نانو لوله‌های کربن (۰، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی گرم بر لیتر) و کینتین (۰، ۲ و ۴ میلی گرم بر لیتر) منتقل شدند. پس از گذشت ۴۰ روز برخی شاخص‌های مورفوفیزیولوژیکی و فیتوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که اثر متقابل نانولوله‌های کربن و کینتین بر شاخص‌های وزن تر، تعداد شاخه، تعداد برگ، تعداد ریشه، سطح برگ، طول ریشه، ارتفاع گیاهچه، درصد زنده‌مانی، درصد جوانه‌زنی، محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی معنی‌دار نبود. در مقابل، اثر متقابل دو تیمار بر محتوای فلاونوئید و فنل کل اختلاف معنی‌دار را نشان داد. بیشترین محتوای فنل در ترکیب تیماری ۸۰ میلی گرم بر لیتر نانولوله کربن و ۴ میلی گرم بر لیتر کینتین به دست آمد. از طرف دیگر، افزایش غلظت نانو لوله‌های کربن تا ۸۰ میلی گرم بر لیتر، میانگین تولید شاخساره، تعداد برگ، سطح برگ، ارتفاع گیاه، تعداد ریشه، طول ریشه، محتوای کلروفیل a، b، کارتنوئید، محتوای فنل و فلاونوئید را به طور معنی‌داری افزایش داد. همچنین با افزایش غلظت کینتین (۴ میلی گرم بر لیتر)، تعداد شاخه، محتوای کلروفیل a و b به طور معنی‌داری افزایش یافت. بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش می‌توان از نانو لوله‌های کربن (۸۰ میلی گرم بر لیتر) به منظور پرآوری و افزایش متابولیت‌های گیاه مریم گلی استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: سایتوکینین، کشت بافت، مریم گلی، نانو لوله‌های کربن

مقدمه

گیاهان دارویی یکی از ارزشمندترین منابع طبیعی هر کشوری هستند که در صورت شناخت علمی، کشت، توسعه و بهره‌برداری صحیح می‌توانند نقش مهمی در سلامت جامعه، صادرات غیرنفتی و اشتغال‌زایی داشته باشند (Govil and Singh, 2010). گونه *Salvia nemorosa* گیاهی علفی و چندساله، به‌علت داشتن کرک‌های ترش‌حی که سرشار از روغن‌های اتری و اسانس می‌باشد به‌عنوان گیاه زینتی، دارویی، معطر و مغذی کاربرد دارد. وجود انواع ترپن‌ها در این گونه، آن‌را به‌عنوان یک گیاه دارویی مفید مجزا ساخته است. ترکیبات ترپنی شناسایی شده در این گونه شامل مونوترپن‌ها و سسکوئید ترپن‌ها و ترکیبات غیرفرار ترپنی از جمله دی‌ترپن‌ها و تری‌ترپن‌ها می‌باشند. همچنین در این گیاهان ترکیباتی مانند پلی‌فنول‌ها و فنول‌هایی مانند فلاونوئیدها و همچنین مشتقات کافئیک اسید نیز یافت شده است (Ulubelen, 1994). فعالیت‌های بیولوژیکی مریم گلی ناشی از وجود رزماریک اسید و مشتقات آن است. این ترکیبات دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی، ضد تومور، ضد موتاسیون، ضدقارچ، ضد ویروس و باکتری می‌باشند (Salimpour et al., 2014).

نانو مولکول‌ها موادی هستند که اخیراً از طریق نانو فناوری ایجاد شده‌اند. توسط این ساختارها، امکان دست‌کاری‌ها در سطح نانو و تنظیم و کاتالیز واکنش‌های شیمیایی وجود دارد. در این میان، نانو لوله‌های کربنی نوعی دگرشکلی از اتم‌های کربن هستند که در سال‌های اخیر شناسایی شده‌اند (Ke et al., 2011). یکی از ویژگی‌های مهم نانو لوله‌های کربنی این است که می‌توان آن‌ها را به حالت محلول در آب درآورد و با توجه به خاصیت آب‌دوستی در زمینه‌های شیمیایی و بیولوژیکی مورد استفاده قرار داد (Dobranszki et al., 2005). نانو لوله‌های کربنی محلول در آب به روش‌های مختلفی نظیر، استفاده در محیط کشت سلول گیاهی، بذر یا گیاهچه (Wang et al., 2012)، استفاده در آبیاری گیاهان و یا به صورت ترکیب با خاک رشدی گیاه (Khodakovskaya et al., 2012) مورد استفاده قرار می‌گیرند و باعث افزایش میزان رشد در قسمت‌های مختلف گیاهان نظیر ریشه، ساقه و شاخه‌ها می‌شوند (Tripathi et al., 2011). کاربرد نانو لوله‌های کربنی در کشاورزی اغلب در زمینه سموم گیاهی، انتقال ژن، بهبود مقاومت در برابر بیماری‌های گیاهی، استفاده در مواد مغذی کارآمد و افزایش رشد گیاهان می‌باشد (Wang et al., 2012). توانایی این مواد در افزایش رشد گیاهان اغلب به دلیل ساختار و ویژگی‌های فیزیکی آن‌ها می‌باشد. علاوه بر این، توانایی افزایش رشد گیاه توسط نانو لوله‌های کربنی به انواع آن‌ها (تک لایه یا چند لایه بودن) و همچنین وجود گروه‌های عاملی بر روی سطح آن‌ها نسبت داده شده است (Lacerda et al., 2012).

انتخاب محیط کشت و تهیه فرمولاسیون سازگار با بافت گیاه مورد آزمایش، برای موفقیت در کشت بافت ضروری است. هیچ محیط کشت مشخصی را نمی‌توان برای رشد انواع مختلف ریز نمونه توصیه کرد و در اغلب موارد لازم است تغییراتی

در محیط کشت به منظور پاسخ‌دهی بهتر انواع مختلف ریز نمونه صورت پذیرد (Smith, 2000). تنظیم کننده‌های رشد گیاهی به ویژه سایتوکینین‌ها کاربرد بسیار فراوانی در کشت بافت گیاهان دارند و باعث تنظیم رشد و نمو اندام‌ها در محیط درون شیشه‌ای می‌گردند. همچنین این ترکیبات، در تولید جنین در کشت سوسپانسیون سلولی اهمیت بسیار زیادی دارند (Bhojwani and Dantu, 2013). در کشت شاخساره که فعالیت مریستم‌ها توسط هورمون‌ها کنترل می‌شود، به‌طور معمول از سایتوکینین استفاده می‌گردد. سایتوکینین‌ها معمولاً در تقسیمات سلولی و تمایزیابی شاخه‌های نابجا از کالوس و بافت‌های گیاهی شرکت می‌کنند. این ترکیبات به‌طور معمول با حذف غالبیت انتهایی باعث پرآوری شاخه‌ها می‌شوند. (Bagheri *et al.*, 2013).

پاسخ‌های متنوعی در زمینه کاربرد نانو لوله‌های کربنی بر رشد و فیزیولوژی گیاهان مشاهده شده است که این تنوع به نوع نانو لوله‌های مورد استفاده و گونه گیاهی وابسته است. در پژوهشی گزارش شد که این ترکیبات تأثیر مثبتی بر افزایش طول ریشه خیار و پیاز داشته، رشد ریشه گوجه فرنگی را کاهش داده و بر رشد ریشه هویج و کلم تأثیر نداشته است (Cañas *et al.* 2008). در مطالعه دیگری، نانو لوله‌های کربنی سبب افزایش درصد و سرعت جوانه زنی، افزایش طول ساقه و همچنین افزایش ۲/۵ برابری وزن دانه‌ها در بذور گوجه‌فرنگی شد، ولی بر طول ریشه دانه‌ها تأثیری نداشت (Khodakovskaya *et al.* 2009). در تحقیق دیگری بر روی گوجه‌فرنگی مشخص شد که نانولوله‌های کربن سبب افزایش دو برابری زیست توده این گیاه شده و بر سایر ویژگی‌های رشدی آن تأثیر نداشته است (Alimohammadi *et al.* 2011).

در سال‌های اخیر، نحوه تأثیر نانوذرات بر روی رشد و نمو گیاهان مورد توجه قرار گرفته است، با این حال، هنوز خلأهایی در رابطه با تأثیر نانومواد بر رشد گیاهان دارویی وجود دارد. با وجود مطالعات بسیاری که بر روی مریم گلی صورت گرفته است، هنوز اطلاعاتی در مورد تأثیر نانولوله‌های کربنی به همراه تنظیم کننده‌های رشد گیاهی به ویژه کینتین بر ویژگی‌های رشدی و فیتوشیمیایی مریم گلی در دسترس نیست. از این رو، در این مطالعه غلظت‌های مختلف این دو فاکتور بر شاخص‌های متعددی بررسی خواهد شد تا غلظت‌های بهینه به دست آید.

مواد و روش‌ها

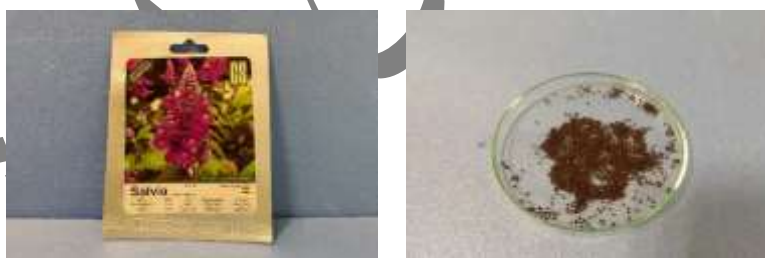
مطالعه حاضر در محل آزمایشگاه کشت بافت و بیوتکنولوژی گروه علوم باغبانی و فضای سبز دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه محقق اردبیلی انجام گرفت. این پژوهش به صورت آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی و با ۵ تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایشی مورد استفاده شامل کینتین در ۳ سطح صفر (شاهد)، ۲ و ۴ میلی گرم بر لیتر و همچنین نانو لوله‌های کربن (US Research Nanomaterials, Inc.) در ۵ سطح صفر (شاهد)، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی گرم بر لیتر بوده است. ویژگی‌های نانولوله‌های کربنی به شرح زیر بود:

Single-walled carbon nanotubes (SWNTs, SWCNTs)	
Purity	Single-walled nanotubes > 90 wt%
OD	1-2 nm
ID	0.8-1.6 nm
Average diameter	1.1 nm
Length	5-30 um (TEM)
SSA	> 380 m ² /g
Ash	< 1.5 wt%

Tap density	0.14g/cm ³
True density	~2.1g/cm ³
Electric Conductivity	> 100 S/cm
Thermal Conductivity	50-200 W/m.K
Color	black
Single-walled Carbon Nanotubes (SWNTs, SWCNTs) Manufacturing Method	CVD

به منظور پراکندگی^۲ نانولوله‌های کربنی، مقادیر مناسبی (بر اساس غلظت‌های مورد آزمایش) از آن‌ها در آب دیونیزه شده به شکل سوسپانسیون حل شدند. سپس به مدت ۳۰ دقیقه (۶ بار به مدت ۵ دقیقه) تحت اولتراسونیک کاملاً همگن شدند. هر ۵ دقیقه یک بار دستگاه متوقف شد تا از بروز گرما و تولید کف جلوگیری شود. پس از اولتراسونیک، مایع همگن با دور ۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد تا ذرات حل نشده حذف شود. این مایع حاصل تا بیش از ۶ ماه می‌تواند پایدار باشد.

برای انجام این پژوهش بذرهای مریم گلی (*Salvia nemorosa*) (شکل ۱) ابتدا به مدت ۴۰ ثانیه در الکل اتانول ۷۰ درجه به صورت سطحی ضدعفونی شدند. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد قرار گرفتند و پس از آن سه بار (۳، ۵ و ۱۵ دقیقه) با آب دیونیزه شسته شدند. بذور ضدعفونی شده در شیشه مربایی حاوی محیط کشت MS با ۳۰ گرم ساکارز و ۸ گرم آگار کشت شدند. بذرهای کشت شده سپس به اتاقک رشد با دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد و لامپ‌های فلورسنت با شدت نور ۲۰۰۰ لوکس (۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) انتقال یافتند. پس از مدت ۴۰ روز گیاهان حاصل از رشد بذرها بعد از حذف برگ‌ها به صورت تک گره برش داده شده و در محیط تیمار اصلی کشت شدند. پس از ۶۰ روز، گیاهان از نظر شاخص‌های متعددی مورد بررسی قرار گرفتند.



شکل ۱- بذر گیاه مریم گلی گونه *Salvia nemorosa*
Figure 1- Seeds of *Salvia nemorosa* species

پس از خارج کردن گیاهچه‌ها از محیط کشت، ابتدا محیط کشت اطراف آن‌ها به صورت کامل تمیز شده و سپس با استفاده از ترازو، وزن تر اندازه‌گیری شد. تعداد سرشاخه و برگ و ریشه شمارش گردید. اندازه‌گیری سطح برگ با استفاده از دستگاه سطح برگ سنج (مدل دلتا تی انگلستان) اندازه‌گیری شد. طول ریشه و ارتفاع گیاهچه نیز با استفاده از خط‌کش اندازه‌گیری گردید. درصد زنده‌مانی و جوانه‌زنی گیاهچه‌ها پس از خروج از محیط کشت محاسبه شد.

به منظور اندازه‌گیری کلروفیل a، b و کارتنوئید از روش لیختن تالر (Lichtenthaler, 1987) استفاده شد. عصاره به دست آمده در دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج‌های ۶۴۵، ۶۶۳ و ۴۷۰ نانومتر قرائت شد. غلظت نهایی کلروفیل a و b و کارتنوئید با استفاده از روابط زیر محاسبه شد:

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

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

$$\text{Carotenoides} = 1000(A470) - 3.27(\text{mg chl. a}) - 104(\text{mg chl. b})/2$$

میزان ترکیبات فنلی موجود در عصاره گیاه بر اساس روش اسلینکارد و سینگلتن (Slinkard and Singleton, 1977)، با کمی تغییر و با استفاده از معرف فولین سیوکالتیو اندازه‌گیری شد سپس میزان جذب رنگ در طول موج ۷۶۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد.

اندازه‌گیری فلاونوئید به روش رنگ سنجی آلومینیوم کلرید و با روش کومار و شرما (Kumar and Sharma, 2015)، انجام شد. جذب مخلوط در طول موج ۴۱۵ نانومتر خوانده شد.

در مطالعه حاضر ۵ تکرار و در هر واحد آزمایشی ۴ گیاهچه در نظر گرفته شد. داده‌های بدست آمده مربوط به آزمایش با نرم افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و مقایسه میانگین‌ها نیز با آزمون دانکن انجام گرفت و نمودارها با استفاده از نرم افزار اکسل رسم گردید.

نتایج و بحث

تعداد شاخه پرآوری شده

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر متقابل نانولوله‌های کربن و کینتین بر تعداد شاخه پرآوری شده معنی‌دار نبود. با این حال، غلظت‌های مختلف نانو لوله‌های کربن و کینتین به تنهایی بر تعداد شاخه پرآوری شده مریم گلی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). مقایسه میانگین داده‌ها نیز نشان داد بیشترین تعداد شاخه پرآوری شده (۴ عدد) مربوط به غلظت ۸۰ میلی گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربن بود که با تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار داشت (شکل ۲-الف). از طرف دیگر، مقایسه میانگین داده‌ها نیز نشان داد بیشترین تعداد شاخه پرآوری شده (۳ عدد) مربوط به غلظت ۴ میلی گرم بر لیتر کینتین و کمترین آن (۲ عدد) مربوط تیمار شاهد بوده است (شکل ۲-ب). در پژوهشی دیگر تأثیر نانو لوله‌های کربن چند جداره بر باززایی درون شیشه‌ای گیاه سیب زمینی مورد مطالعه قرار گرفت. در این پژوهش در غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر نانو لوله کربنی افزایش شاخه‌زایی و باززایی مشاهده شد. در پژوهشی دیگر استفاده از غلظت ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر نانو لوله کربنی به همراه ۲ میلی گرم بر لیتر بنزیل آدنین منجر به بیشترین شاخه‌زایی و باززایی در پسته گردید (Aghasi et al., 2018).

جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر نانو لوله‌های کربن، سایتوکینین و اثرات متقابل آن‌ها بر صفات گیاه مریم گلی

Table 1- Analysis of variance for effect of carbon nanotubes, cytokine and their interaction effect on parameters of *Salvia nemorosa*

میانگین مربعات

Mean squared

منابع تغییرات Source of variations	درجه آزادی Df	وزن تر Fresh weight	تعداد شاخه پرآوری شده Number of branch	تعداد برگ Number of leaves	تعداد ریشه Number of roots	سطح برگ leaf area	طول ریشه Root length	ارتفاع گیاهچه Seedling height	درصد زنده-مانی Survival percentage	درصد جوانه زنی Germination percent age
نانولوله های کربن Carbon nanotubes (mg/L)	4	0.0280 ^{ns}	08239 ^{**}	3.5114 ^{**}	2.6798 ^{**}	3.3563 ^{**}	6.3546 [*]	19718 ^{**}	1.3830 ^{ns}	0.9945 ^{ns}
سایتوکینین Cytokine (mg/L)	2	0.0043 ^{ns}	08532 ^{**}	09024 ^{ns}	0.6103 ^{ns}	0.4837 ^{ns}	4.0080 ^{ns}	0.3753 ^{ns}	0.4602 ^{ns}	0.2935 ^{ns}
نانولوله × سایتوکینین Carbon nanotube × Cytokine (mg/L) × (mg/L)	8	0.0158 ^{ns}	0.1992 ^{ns}	0.8741 ^{ns}	0.7082 ^{ns}	0.1183 ^{ns}	2.2804 ^{ns}	0.0815 ^{ns}	4.8010 ^{ns}	4.1790 ^{ns}
خطا Errors	60	0.012	0.164	0.83	0.658	0.232	2.28	0.126	7.08	6.52

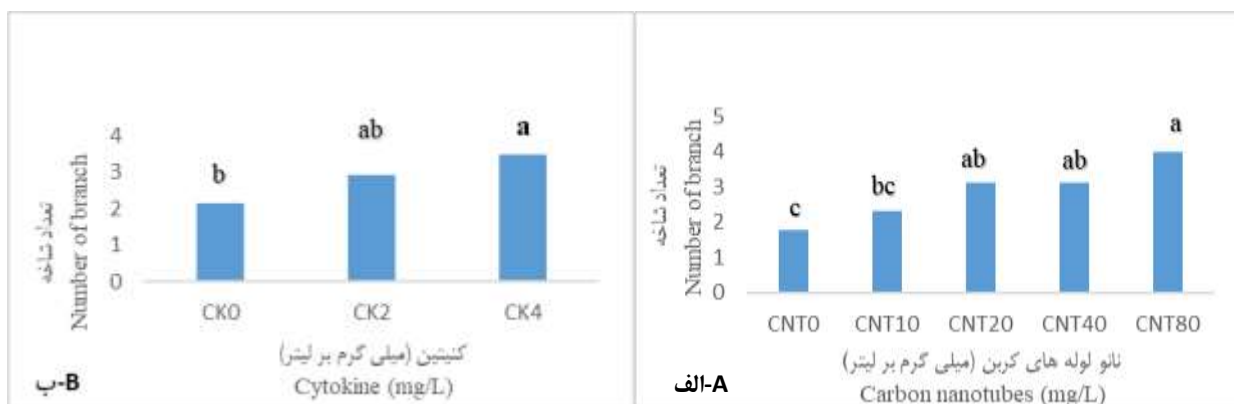
ادامه جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر نانو لوله های کربن، سایتوکینین و اثرات متقابل آن ها بر صفات گیاه مریم گلی

Table 1 Continued- Analysis of variance for effect of carbon nanotubes, cytokine and their interaction effect on parameters of *Salvia nemorosa*

منابع تغییرات Source of variations	درجه آزادی Df	میانگین مربعات Mean squared				
		کلروفیل a Chlorophyll a	کلروفیل b Chlorophyll b	کارتونوئیدها Carotenoids	فلاونوئید کل Total Flavonoid	فنل کل Total phenol
نانولوله های کربن Carbon nanotubes(mg/L)	4	0.096 ^{**}	0.103 ^{**}	0.29 ^{**}	0.238 ^{**}	6.484 ^{**}
سایتوکینین Cytokine(mg/L)	2	0.013 [*]	0.014 [*]	0.013 ^{ns}	3.548 ^{**}	103.59 ^{**}
نانولوله × سایتوکینین Carbon nanotube × Cytokine(mg/L) × (mg/L)	8	0.003 ^{ns}	0.0043 ^{ns}	0.008 ^{ns}	0.018 [*]	0.236 ^{**}
خطا Errors	60	0.004	0.0043	0.008	0.104	0.0034

^{ns}, * و ** به ترتیب عدم معنی داری، معنی داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد.

ns, * and **: Non-significant, significant at 5% and 1% of probability levels, respectively.

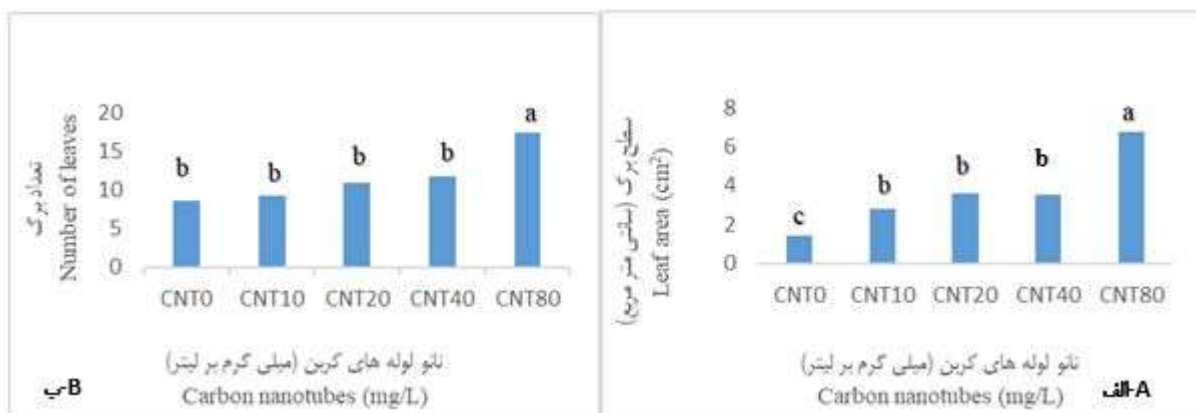


شکل ۲- تأثیر نانو لوله‌های کربن (الف) و کینتین (ب) بر تعداد شاخه پرآوری شده مریم‌گلی، CNT0: شاهد، CNT10: ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT20: ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT40: ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT80: ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CK0: شاهد، CK2: ۲ میلی‌گرم بر لیتر کینتین، CK4: ۴ میلی‌گرم بر لیتر کینتین

Figure 2- Effect of carbon nanotubes (A) and kinetin (B) on the number of branches in *Salvia nemorosa*, CNT0: control, CNT10: 10 mg/liter of carbon nanotubes, CNT20: 20 mg/liter of carbon nanotubes, CNT40: 40 mg/liter of carbon nanotubes, CNT80: 80 mg/liter of carbon nanotubes, CK0: control, CK2: 2 mg/liter kinetin, CK4: 4 mg/liter of kinetin

تعداد برگ و سطح برگ

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که اثر متقابل دو فاکتور بر شاخص تعداد برگ و سطح برگ معنی‌دار نبود. با این حال، غلظت‌های مختلف نانو لوله‌های کربن به طور معنی‌داری (در سطح احتمال یک درصد) این شاخص‌ها را تحت تأثیر قرار دادند (جدول ۱). مقایسه میانگین تأثیر این ماده بر شاخص تعداد برگ نشان داد که با افزایش غلظت نانو لوله کربن تعداد برگ تولید شده نیز افزایش یافت به طوری که غلظت ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر بیشترین تعداد برگ (۱۷ عدد) را تولید کرد. کمترین برگ نیز (۸ عدد) از تیمار شاهد به دست آمد (شکل ۳-الف). همچنین مقایسه میانگین تأثیر نانو لوله‌های کربن بر شاخص سطح برگ نشان داد که بیشترین سطح برگ (۶ سانتی متر مربع) مربوط به تیمار ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله کربن و کمترین (۱/۴ سانتی متر مربع) در تیمار شاهد به دست آمد که اختلاف معنی‌داری داشتند (شکل ۳-ب). در پژوهشی تأثیر غلظت‌های مختلف نانو لوله‌های کربنی در گوجه فرنگی مورد بررسی قرار گرفت که در آن بیشترین سطح برگ و تعداد برگ (۴۲ عدد) در غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر گزارش شد (Khodakovskaya, 2013). در پژوهش دیگری که بر روی گیاه نخود صورت گرفته، استفاده از نانو لوله‌های کربنی تک جداره با غلظت ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر منجر به افزایش تعداد شاخه، برگ و همچنین سطح برگ گردیده است. در واقع نانو لوله‌های کربنی تک جداره منجر به جذب بهتر آب می‌شوند و در نتیجه رشد قسمت‌های مختلف گیاه افزایش می‌یابد (Tripathi et al., 2011).

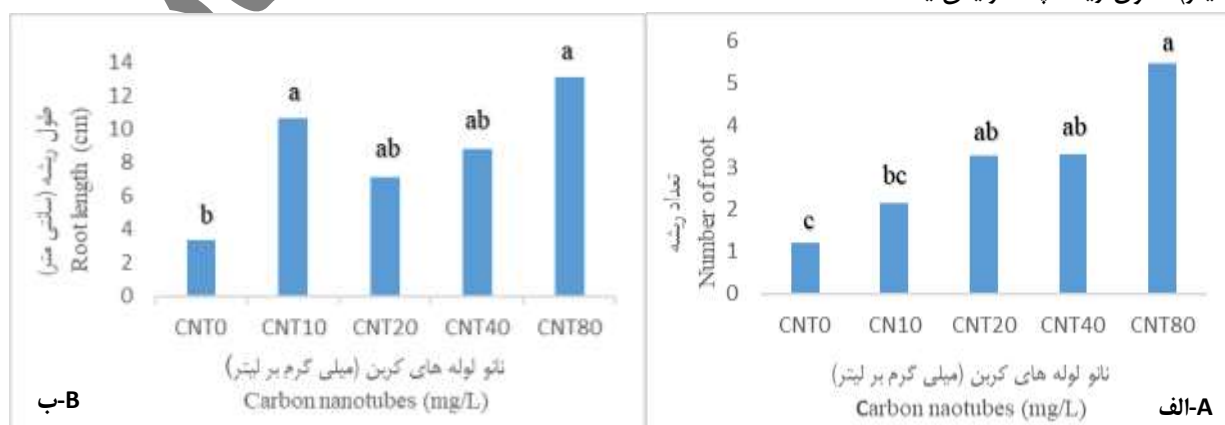


شکل ۳- تأثیر نانو لوله‌های کربن بر تعداد برگ (الف) و سطح برگ (ب) گیاه مریم گلی، CNT0: شاهد، CNT10: ۱۰ میلی گرم بر لیتر نانولوله‌های کربنی، CNT20: ۲۰ میلی گرم بر لیتر نانولوله‌های کربنی، CNT40: ۴۰ میلی گرم بر لیتر نانولوله‌های کربنی، CNT80: ۸۰ میلی گرم بر لیتر نانولوله‌های کربنی

Figure 3- Effect of carbon nanotubes on the number of leaves (A) and leaf area (B) in *Salvia nemorosa*, CNT0: control, CNT10: 10 mg/liter of carbon nanotubes, CNT20: 20 mg/liter of carbon nanotubes, CNT40: 40 mg/liter of carbon nanotubes, CNT80: 80 mg/liter of carbon nanotubes

تعداد ریشه و طول ریشه

شاخص تعداد ریشه و طول ریشه به طور معنی‌داری تحت تأثیر اثر متقابل دو تیمار قرار نگرفت. با این حال، بررسی تجزیه واریانس داده‌های مربوط به شاخص‌های تعداد ریشه و طول ریشه مشخص گردید که تأثیر نانو لوله‌های کربن بر این شاخص‌ها به ترتیب در سطح احتمال یک درصد و پنج درصد معنی‌دار است (جدول ۱). همچنین مقایسه میانگین تأثیر این ماده بر شاخص تعداد ریشه نیز نشان داد که با افزایش غلظت نانو لوله کربن تعداد ریشه تولید شده افزایش یافته به طوری که کمترین ریشه تولید شده در شاهد (۱ عدد) و بیش‌ترین در غلظت ۸۰ میلی گرم بر لیتر نانولوله کربنی (۵ عدد) به دست آمد (شکل ۴-الف). همچنین مقایسه میانگین تأثیر نانو لوله‌های کربن بر طول ریشه نشان داد که بلندترین طول ریشه (۱۳ سانتی‌متر) مربوط به غلظت ۸۰ میلی گرم بر لیتر نانو لوله کربن و کوتاه‌ترین (۳ سانتی‌متر) مربوط به تیمار شاهد بوده است (شکل ۴-ب). نانو لوله‌های کربنی با توجه به تنش محیطی که ایجاد می‌کنند گیاهان تحت تیمار را وادار به گسترش اندام‌های زیر زمینی خود می‌کنند و بدین ترتیب گیاه شرایط تنش را تحمل می‌کند (Falahi et al., 2009). عبادی و همکاران (Ebadi et al., 2012) گزارش کردند که در گیاه مریم گلی سهندی تحت تأثیر تیمار نانو لوله‌های کربن (۲۰۰ میلی گرم بر لیتر)، طول ریشه‌چه افزایش یافته است.

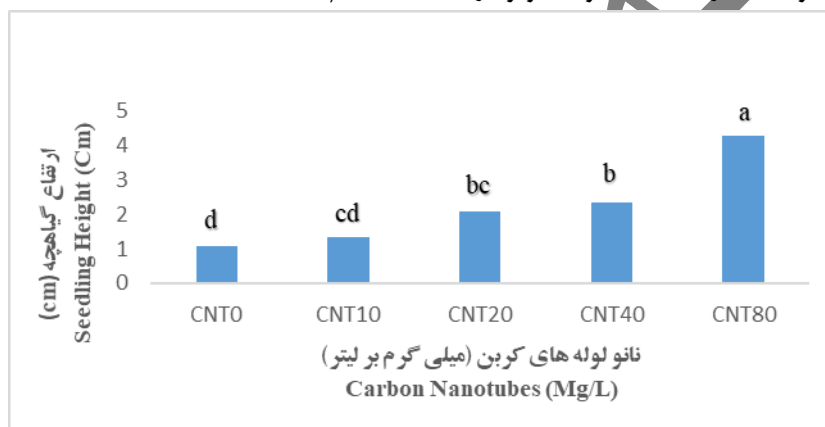


شکل ۴- مقایسه میانگین تأثیر نانو لوله‌های کربن بر تعداد ریشه (الف) و طول ریشه (ب) گیاه مریم گلی، CNT0: شاهد، CNT10: ۱۰ میلی گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT20: ۲۰ میلی گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT40: ۴۰ میلی گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT80: ۸۰ میلی گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی

Figure 4- Effect of carbon nanotubes on the number of roots (A) and root length (B) in *Salvia nemorosa*, CNT0: control, CNT10: 10 mg/liter of carbon nanotubes, CNT20: 20 mg/liter of carbon nanotubes, CNT40: 40 mg/liter of carbon nanotubes, CNT80: 80 mg/liter of carbon nanotubes

ارتفاع گیاهچه

در رابطه با شاخص ارتفاع گیاهچه مشاهده شد که غلظت‌های مختلف نانو لوله‌های کربن به طور معنی‌داری (سطح احتمال یک درصد) طول گیاهچه را تحت تأثیر قرار داده‌اند، ولی اثر متقابل نانو لوله‌های کربن و کینتین معنی‌دار نشد (جدول ۱). بلندترین طول گیاهچه (۴ سانتی‌متر) مربوط به تیمار ۸۰ میلی گرم بر لیتر نانو لوله کربن و کوتاه‌ترین آن (۱ سانتی‌متر) مربوط به شاهد اندازه‌گیری شده است که اختلاف معنی‌داری را باهم نشان دادند (شکل ۵). کاربرد ریز لوله‌های کربنی چند جداره کربوکسیله سبب افزایش درصد و سرعت جوانه‌زنی بذر و همچنین وزن تر و خشک ریشه و ساقه، تعداد و اندازه برگ، طول ریشه و ساقه در سه گیاه سویا، جو و ذرت شده است (Lahiani et al., 2013).



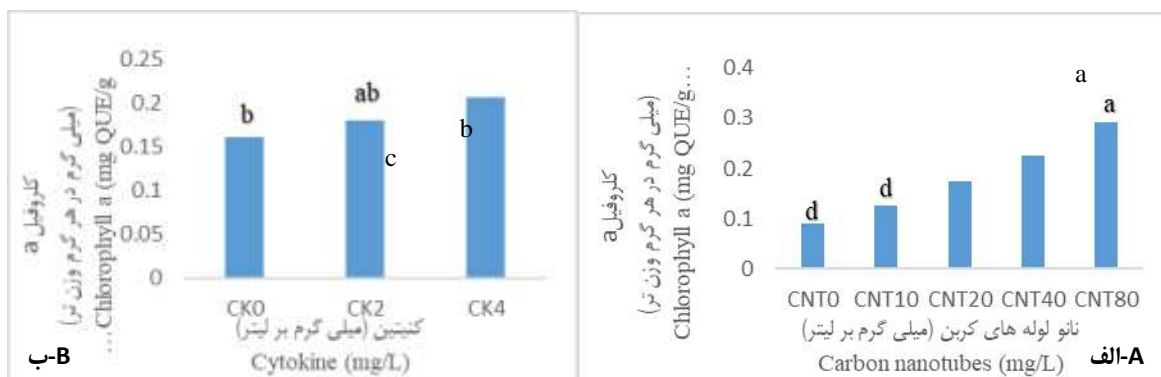
شکل ۵- مقایسه میانگین تأثیر نانو لوله‌های کربن بر ارتفاع گیاهچه مریم گلی، CNT0: شاهد، CNT10: ۱۰ میلی گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT20: ۲۰ میلی گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT40: ۴۰ میلی گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT80: ۸۰ میلی گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی

Figure 5- Effect of carbon nanotubes on the seedling height in *Salvia nemorosa*, CNT0: control, CNT10: 10 mg/liter of carbon nanotubes, CNT20: 20 mg/liter of carbon nanotubes, CNT40: 40 mg/liter of carbon nanotubes, CNT80: 80 mg/liter of carbon nanotubes.

کلروفیل a

با استفاده از تجزیه واریانس داده‌ها مشاهده گردید که تأثیر نانو لوله‌های کربن بر میزان کلروفیل a در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بوده است. در صورتیکه، اثر متقابل دو فاکتور مورد آزمایش بر شاخص کلروفیل a معنی‌دار نبود (جدول ۱). به عبارت دیگر میزان کلروفیل a به موازات افزایش نانو لوله‌های کربن، افزایش یافته است. بیش‌ترین میزان کلروفیل a (۰/۲۹۳ میلی گرم) مربوط به تیمار ۸۰ میلی گرم بر لیتر نانو لوله کربن و کمترین آن (۰/۰۹۱ میلی گرم) در تیمار شاهد مشاهده گردید که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشتند (شکل ۶-الف). همچنین تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که غلظت‌های مختلف کینتین به طور معنی‌داری (سطح احتمال پنج درصد) میزان کلروفیل a را افزایش داده است (جدول ۱). بعد از مقایسه میانگین داده‌ها مشخص شد که همزمان با افزایش غلظت کینتین، میزان کلروفیل a نیز افزایش یافته است.

بیشترین میزان کلروفیل a (۰/۲۰۶ میلی گرم) مربوط به تیمار ۴ میلی گرم بر لیتر کینتین و کمترین میزان کلروفیل a (۰/۱۶ میلی گرم) در تیمار شاهد مشاهده شد (شکل ۶-ب).

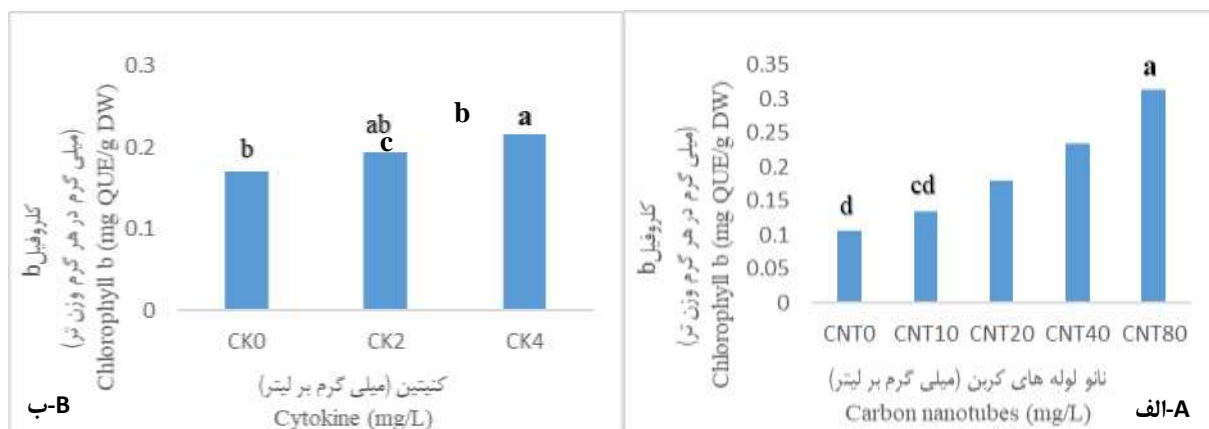


شکل ۶- مقایسه میانگین تأثیر نانو لوله‌های کربن (الف) و کینتین (ب) بر میزان کلروفیل a در گیاه مریم گلی، CNT0: شاهد، CNT10: ۱۰ میلی گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT20: ۲۰ میلی گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT40: ۴۰ میلی گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT80: ۸۰ میلی گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CK0: شاهد، CK2: ۲ میلی گرم بر لیتر کینتین، CK4: ۴ میلی گرم بر لیتر کینتین

Figure 6- Effect of carbon nanotubes (A) and kinetin (B) on chlorophyll a content in *Salvia nemorosa*, CNT0: control, CNT10: 10 mg/liter of carbon nanotubes, CNT20: 20 mg/liter of carbon nanotubes, CNT40: 40 mg/liter of carbon nanotubes, CNT80: 80 mg/liter of carbon nanotubes, CK0: control, CK2: 2 mg/liter kinetin, CK4: 4 mg/liter of kinetin

کلروفیل b

در رابطه با کلروفیل b، ترکیب تیماری نانو لوله‌های کربن و کینتین تأثیر معنی‌داری را نشان ندادند. در مقابل، غلظت‌های مختلف نانو لوله‌های کربن به طور معنی‌داری (سطح احتمال یک درصد) محتوای کلروفیل b را تحت تأثیر قرار داده است (جدول ۱). طوری که به موازات افزایش غلظت نانو لوله‌های کربن میزان کلروفیل b نیز افزایش یافته است. بیشترین میزان کلروفیل b (۰/۳۱۳ میلی گرم) مربوط به تیمار ۸۰ میلی گرم بر لیتر نانو لوله کربن بوده و کمترین میزان (۰/۱۰۵ میلی گرم) در تیمار شاهد ثبت گردید. (شکل ۷-الف). با توجه به نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها، تأثیر غلظت‌های مختلف کینتین بر میزان کلروفیل b در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۲-۴). در واقع همزمان با افزایش غلظت کینتین، میزان کلروفیل b نیز افزایش یافته است. بیشترین میزان کلروفیل b (۰/۲۱۷ میلی گرم) مربوط به تیمار ۴ میلی گرم بر لیتر کینتین و کمترین میزان کلروفیل b (۰/۱۷ میلی گرم) در تیمار شاهد مشاهده شد که باهم اختلاف معنی‌داری داشتند (شکل ۷-ب).

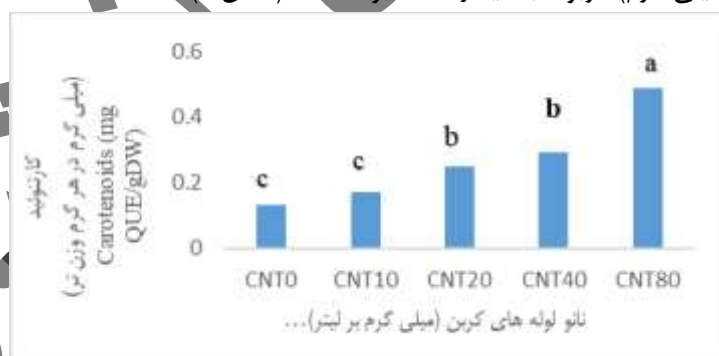


شکل ۷- مقایسه میانگین تأثیر نانو لوله‌های کربن (الف) و کینتین (ب) بر میزان کلروفیل b در گیاه مریم گلی، شاهد، CNT10: ۱۰ میلی گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT20: ۲۰ میلی گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT40: ۴۰ میلی گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT80: ۸۰ میلی گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، شاهد، CK0: کینتین، CK2: ۲ میلی گرم بر لیتر کینتین، CK4: ۴ میلی گرم بر لیتر کینتین

Figure 7- Effect of carbon nanotubes (A) and kinetin (B) on chlorophyll b content in *Salvia nemorosa*, CNT0: control, CNT10: 10 mg/liter of carbon nanotubes, CNT20: 20 mg/liter of carbon nanotubes, CNT40: 40 mg/liter of carbon nanotubes, CNT80: 80 mg/liter of carbon nanotubes, CK0: control, CK2: 2 mg/liter kinetin, CK4: 4 mg/liter of kinetin

کارتنوئید

محتوای کارتنوئید به طور معنی‌داری تحت تأثیر اثر متقابل دو تیمار مورد آزمایش قرار نگرفت. از سوی دیگر، تأثیر نانو لوله‌های کربن بر محتوای کارتنوئید در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). همچنین مقایسه میانگین تأثیر نانو لوله‌های کربن بر شاخص کارتنوئید نیز بیان‌گر این مطلب است که همزمان با افزایش غلظت نانو لوله‌های کربن میزان کارتنوئید نیز افزایش یافته است. بیش‌ترین میزان کارتنوئید (۰/۴۸۸ میلی گرم) مربوط به غلظت ۸۰ میلی گرم بر لیتر و کمترین میزان آن (۰/۱۳۳ میلی گرم) مربوط به تیمار شاهد بوده است (شکل ۸).



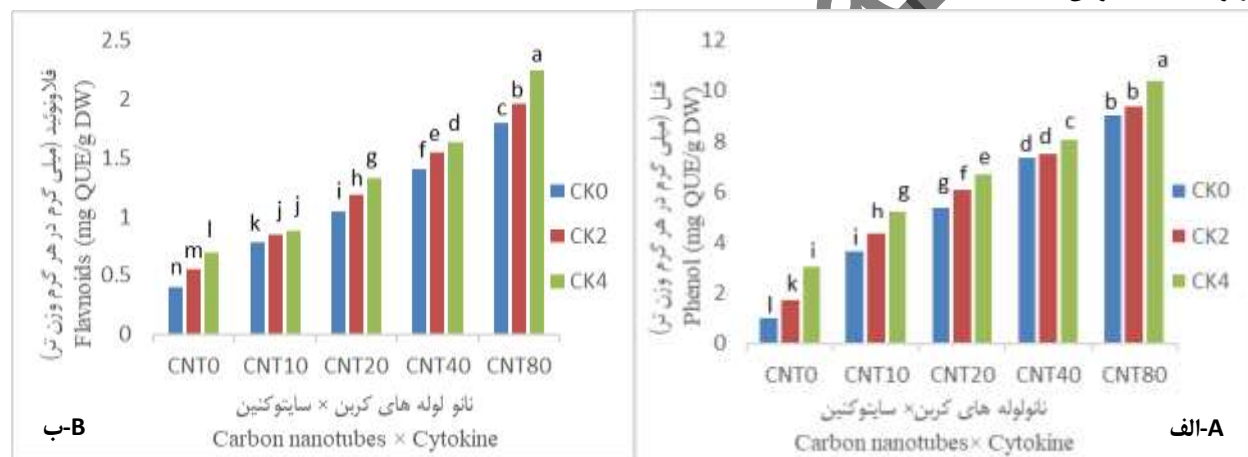
شکل ۸- تأثیر نانو لوله‌های کربن بر میزان کارتنوئید در گیاه مریم گلی، شاهد، CNT10: ۱۰ میلی گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT20: ۲۰ میلی گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT40: ۴۰ میلی گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT80: ۸۰ میلی گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی

Figure 8- Effect of carbon nanotubes on carotenoid content in *Salvia nemorosa*, CNT0: control, CNT10: 10 mg/liter of carbon nanotubes, CNT20: 20 mg/liter of carbon nanotubes, CNT40: 40 mg/liter of carbon nanotubes, CNT80: 80 mg/liter of carbon nanotubes

فنل و فلاونوئید

مطابق با جدول تجزیه واریانس (جدول ۱)، اثر متقابل تیمارهای نانولوله‌های کربن و کینتین بر محتوای فلاونوئید کل در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود. مقایسه میانگین داده‌ها (شکل ۹-الف) نشان داد که با افزایش غلظت‌های نانولوله‌های کربن و کینتین، محتوای فلاونوئید کل به طور مثبتی افزایش یافته است. بر این اساس، بیشترین محتوای فلاونوئید کل تحت تیمارهای ۸۰ میلی گرم بر لیتر نانولوله کربن و ۴ میلی گرم بر لیتر کینتین به دست آمد. همچنین کمترین محتوای فلاونوئید کل در تیمار شاهد ثبت شد.

بررسی محتوای فنل کل تحت ترکیب تیماری نانولوله‌های کربن و کینتین بیانگر تاثیر معنی‌دار این دو عامل در سطح احتمال ۱ درصد بود (جدول ۱). مشابه با محتوای فلاونوئید کل، افزایش غلظت‌های نانولوله‌های کربن به همراه کینتین موجب تولید بیشترین محتوای فنل کل شد. بیشترین محتوای فنل کل در ترکیب تیماری ۸۰ میلی گرم بر لیتر نانولوله کربن و ۴ میلی گرم بر لیتر کینتین مشاهده شد. علاوه بر این، کمترین محتوای فنل کل در ترکیب تیماری شاهد به دست آمد (شکل ۹-ب). کاربرد غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر نانولوله‌های کربنی چند جداره در کشت کالوس مرزه خوزستانی سبب افزایش بیش از دو برابری در میزان تولید رزمارینیک اسید، سینامیک اسید، فنول کل و فلاونوئید کل و همچنین میزان وزن تر و خشک کالوس شده است (Ghorbanpour, 2015).



شکل ۹- تاثیر متقابل نانولوله‌های کربن و کینتین بر شاخص‌های فنل (الف) و فلاونوئید (ب) مریم گلی، CNT0: شاهد، CNT10: ۱۰ میلی گرم بر لیتر نانولوله‌های کربنی، CNT20: ۲۰ میلی گرم بر لیتر نانولوله‌های کربنی، CNT40: ۴۰ میلی گرم بر لیتر نانولوله‌های کربنی، CNT80: ۸۰ میلی گرم بر لیتر نانولوله‌های کربنی، CK0: شاهد، CK2: ۲ میلی گرم بر لیتر کینتین، CK4: ۴ میلی گرم بر لیتر کینتین

Figure 9- Interaction effect of carbon nanotubes and kinetin on phenol (A) and flavonoid (B) content in *Salvia nemorosa*, CNT0: control, CNT10: 10 mg/liter of carbon nanotubes, CNT20: 20 mg/liter of carbon nanotubes, CNT40: 40 mg/liter of carbon nanotubes, CNT80: 80 mg/liter of carbon nanotubes, CK0: control, CK2: 2 mg/liter kinetin, CK4: 4 mg/liter of kinetin

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، اثر متقابل نانولوله‌های کربن و کینتین بر رشد و باززایی و خواص فیتوشیمیایی مریم گلی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که برخی خصوصیات رشدی از جمله، وزن تر، تعداد شاخه، تعداد برگ، تعداد ریشه، سطح برگ، طول ریشه، ارتفاع گیاهچه، درصد زنده‌مانی، درصد جوانه‌زنی، محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی تحت تاثیر اثر متقابل دو فاکتور قرار نگرفتند. در مقابل، ویژگی‌های فیتوشیمیایی مریم گلی از جمله محتوای فلاونوئید کل و فنل کل تحت تاثیر اثرات مثبت ترکیب تیماری نانولوله‌های کربن و کینتین (۸۰ میلی گرم بر لیتر نانولوله کربن و ۴ میلی گرم بر لیتر کینتین)

افزایش یافتند که این غلظت به منظور افزایش ترکیبات فنلی قابل توصیه است. همچنین برخی ویژگی‌های رشدی در غلظت ۸۰ میلی گرم بر لیتر نانولوله‌های کربن و ۴ میلی گرم بر لیتر کیتین بیشترین مقدار را تولید کردند. با وجود نتایج حاصل از این مطالعه، همچنان می‌توان در تحقیقات آینده از غلظت‌های بالاتر نانولوله‌های کربن به منظور افزایش خواص فیتوشیمیایی و بهره‌وری سایر گیاهان دارویی استفاده نمود.

منابع

1. Aghasi kermani, SH., Hokmabadi, H., Ghanbari jahromi, M., & Nezami, S.R. (2018). *Investigating the effect of nano compounds in the stages of establishment and in vitro processing of pistachio P. integrima x Pistacia atlantica vegetative base*. Iranian Pistachio National Conference, Iran.
2. Alimahammadi, M., Y. Xu, D. Wang, A. S. Biris, M. V. Khodakovskaya, 2011. Physiological responses induced in tomato plants by a two-component nanostructural system composed of carbon nanotubes conjugated with quantum dots and its in vivo multimodal detection. *Nanotechnology*, 22(1): 112-118.
3. Bagheri, A., Moshiri, S., & Khosravinia, S. (2013). Investigating the reaction of explants and growth regulators on callus formation, root formation and in vitro regeneration of Iranian black cumin. *Scientific-Research Journal of Crop Plant Biotechnology*, (3) 8, 53-61. (In Persian)
4. Bhat, S., Maheshwari, P., & Kumar, A. (2002). Mentha species: in vitro regeneration and genetic transformation. *Molecular Biology today*, 3, 11-23.
5. Bhojwani, S. S., Dantu, P. K. (2013). *Plant tissue culture: an introductory text*. Springer, 318.
6. Canas, J. E., M. Long, S. Nations, R. Vadan, L. Dai, M. Luo, R. Ambikapathi, E. H. Lee, D. Olszyk, 2008. Effects of functionalized and nonfunctionalized single-walled carbon nanotubes on root elongation of select crop species. *Environmental Toxicology and chemistry: An International Journal*, 27(1): 1922-1931.
7. Dobranszki, J., Jambor-Benczur, E., Magyar-Tabori, K., & Hudak, I. (2005). Model experiments for establishment of in vitro culture by micrografting in apple. *International journal of Horticultural Science*, 1, 9-47.
8. Ebadi, M., Farzaneh, A., Ebadi, E., & Nemati, S. H. (2012). Evaluation of Some Germination Factors of *Salvia sahendica* Boiss & Buhse in Drought and Salt Stresses Conditions. *Iranian Journal of Field Crops Research*, 10(4), 764-773. (In Persian with English abstract). doi: 10.22067/GSC.V10I4.20387
9. Fallahi, J., Ebadi, M. T., & Ghorbani, R. (2009). The effects of salinity and drought stresses on germination and seedling growth of clary (*Salvia sclarea*). *Environmental Stresses in Crop Sciences*, 1(1), 57-67. (In Persian with English abstract). <https://doi.org/10.22077/escs.2009.7>
10. Farshadfar, M., & Bakhshi khani, R. (2014). *Basics of biotechnology and plant tissue culture First Edition*. Payam Noor University Publications.
11. Ghorbanpour, M. (2015). Major eddential oil constituents, total phenolics and flavonoids content and antioxidant activity of *Salvia officinalis* plant in response to nano-titanium dioxide. *Indian Journal of Plant Physiology*, 20(1), 249-256. (In Persian).
12. Govil, J. N., & Singh, V. K. (2010). *Recent progress in medicinal plant*. Vol 1. Studium Press texas.

13. Jafarnia, S., Khosroshahi, S., Safayi, M., Madah yazdi, V., & Zahmatkeshan, A. (2009). *Aromatic and medicinal plants*. First Edition. Publications of Iran's Green Agriculture Education Complex.
14. Ke, P. C., Lin, S., Reppert, J., Rao, A. M., & Lou, H. (2011). Uptake of carbon-based nanoparticles by mammalian cells and plants. In: Sattler KD (ed) Handbook of nanophysics: nanomedicine and nanorobotics. *CRC Press New York*, 13(3), 1-30.
15. Khodakovskaya, M. V., de Silva, K., Biris, A. S., Dervishi, E., & Villagarcia, H. (2012). Carbon nanotubes induce growth enhancement of tobacco cells. *American Chemical Society Nano*, 6(3), 2128-2135.
16. 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 community. *Small*, 9(1), 1150123.
17. Kumar, S., Kanwar J.K., & Sharma, D.R. (2015). In vitro propagation of Lilium: Review paper. *Advances in Horticultural Science*, 20, 181-188
18. Lacerda, L., Russier, J., Pastorin, G., Herrero, M. A., Venturelli, E., Dumortier, H., Al-Jamal, K. T., Prato, M., Kostarelos, K., & Bianco, A. (2012). Translocation mechanisms of chemically functionalized carbon nanotubes across plasma membranes. *Biomaterials*, 33(1), 3334-3343.
19. Lahiani, M. H., Dervishi, E., Chen, J., Nima, Z., Gaume, A., Biris, A. S., & Khodakovskaya, M. V. (2013). Impact of carbon nanotubes exposure to seeds of valuable crops. *American Chemical Society applied materials & interfaces*, 5(2), 7965-7973.
20. Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic bio-membranes. In: *Methods in Enzymol.* (eds. S. P. Colowick, N. O. Kaplan,). *Academic press. New York*, 48(1), 350-382.
21. Mostallino, M. C., Mascia, M. P., Pisu, M. G., Busonero, F., Talani, G., & Biggio, G. (2004). Inhibition by miltirone of up-regulation of GABAA receptor $\alpha 4$ subunit mRNA by ethanol withdrawal in hippocampal neurons. *European Journal of Pharmacology*, 494, 83-90.
22. Omidbeygi, R. (2005). *Production and processing of medicinal plants*. First Edition. Tehran: Publications of Astan Ghods Razavi.
- 23.
24. Rai, M., & Ingle, A. (2012). Role of nanotechnology in agriculture with special reference to management of insect pests. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94(2), 287-293.
25. Salimpour, F., Mazooji, A., Mazhar, F., & Barzin, G. (2014). Comparative study of antibacterial properties of four species of *Salvia L.* as a medicinal plant. *Journal of Research In Medical Sciences*, 37(4), 205-210. (In Persian with English abstract)
26. Slinkard, K., & Singleton, V.L. (1977). Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28, 49-55
27. Smith, R. H. (2000). *Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments*. *Academic press*, pp 231.
28. Tripathi, S., Sonkar, S. K., & Sarkar, S. (2011). Growth stimulation of gram (*Cicer arietinum*) plant by water soluble carbon nanotubes. *Nanoscale*, 3(3), 1176-1181.

29. Ulubelen, A. (1994). Terpenoids from *Salvia nemorosa*. *Phytochemistry*, 35(4), 1065-1067.
30. Wang, X., Han, H., Liu, X., Gu, X., Chen, K., & Lu, D. (2012). Multi-walled carbon nanotubes can enhance root elongation of wheat (*Triticum aestivum*) plants. *Journal of Nanoparticle Research*, 14(6), 1-10.

فصلنامه
پژوهش
انتشار