مقالات و رویدادهای علمی

سعید شکیب‌منش
کارشناس‌ارشد علوم و تکنولوژی بذر
حوزه مدیریت بذرتحقیقات آموزش، شرکت توسعه کشت دانه‌های روغنی

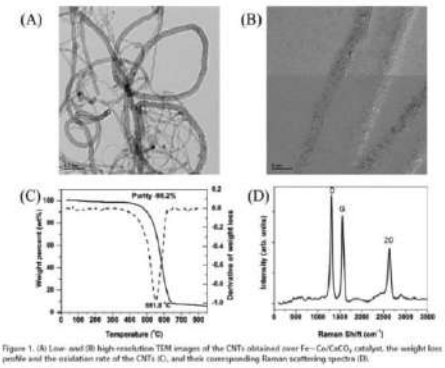
تأثیر نانو لوله‌های کربنی بر جوانه‌زنی و رشد بذور گوجه‌فرنگی (قسمت اول)

Carbon Nanotubes Impacts the Growth and Expression of Water Channel Protein in Tomato Plants (Part one)

بذر، ره‌آورد نانویی طبیعت برای بشر است که به دلیل برخورداری از ساختار منحصربه‌فرد قادر به حفظ بقای خود تحت شرایط نامساعد محیطی است. امکان بهره‌گیری از فناوری نانو به منظور کنترل نمودن پتانسیل کامل بذر وجود دارد. مطالعات کامل و اطلاعات قابل اعتماد در مورد اثرات نانومواد مانند نانولوله‌های کربنی در فیزیولوژی گیاهان و توسعه گیاه در سطح ارگانیسم‌ها بسیار محدود بوده است. بااین‌حال، علاقه گسترده به منظور بررسی توانایی نانوذرات در نفوذ بر دیواره‌های سلول‌های گیاهی و کار سیستم‌های پمپ‌کننده به‌عنوان سیستم هوشمند در گیاهان وجود دارد. این مطالعه اولین گزارش، درمورد اثر نانولوله‌های کربنی CNTs بر پوشش بذر را توصیف می‌کند. دراینجا، نشان داده شد که قرارگرفتن بذر در معرض نانولوله‌های کربنی CNTs در محصولات زراعی باارزش، مانند گوجه‌فرنگی، می‌تواند درصد جوانه‌زنی را افزایش دهد و باعث حمایت و افزایش رشد گردد. پیشبرد این یافته‌ها می‌تواند در پیشرفت‌های قابل توجهی بر بهبود گیاهان در حوزه انرژی منجربه استفاده از تقویت و افزایش زیست‌توده (بیوماس) از گیاهان زمانی که آن‌ها در معرض ماده نانوذرات و کود قرار می‌گیرند. اگرچه در طول چند سال گذشته تعدادی از مطالعات علمی انجام گرفته است، نتایج به دست‌آمده در واقع کاملا متضاد است. تاکنون دو مکتب مخالف فکری وجود دارد، یکی نشان می‌دهد که نانولوله‌های کربنی CNTs دارای اثر سمی قوی در گیاهان، درحالی که دوم نشان می‌دهد که نانولوله‌های کربنی CNTs دارای اثرات مفیدی بر روی جوانه‌زنی بذر، رشد گیاه، و فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاهی مختلف هستند. یکی‌از دلایل پاسخ‌های متفاوت به نانولوله‌ها ممکن است درمیان این مطالعات مورفولوژی و ویژگی‌های نانولوله مورداستفاده در هر بررسی است. به‌عنوان مثال، اندازه نانولوله‌ها، طول، قطر، درجه خلوص، حضور کربن آمورف و تراکم ممکن است. همچنین به‌عنوان گروه‌های عملکردی سطح شیمیایی همه به‌طور چشمگیری می‌تواند پاسخ‌های نانولوله CNT ناشی از (فیزیولوژیکی و ژنتیکی) از گیاهان را تحت‌تأثیر قرار دهد. در آزمایش‌های اخیر شواهدی وجود دارد که نانولوله اکسیده می‌تواند بیان ژن گیاه گوجه‌فرنگی در دوزهای پایین در معرض نانولوله را تحت‌تأثیر قرار دهد. بااین‌حال، درک کامل از مکانیسم‌های مولکولی برای منفی (سمیت) و مثبت (فعال شدن جوانه‌زنی و رشد گیاه) اثرات ناشی از مواد کربن در ابعاد نانو در گیاهان، هنوز وجود ندارد. تاکنون، مشخص نشده که کدام ویژگی خاص نانو لوله‌های کربنی CNTs را می‌توان با بیان ژن‌های و پروتئین‌های که برای رشد گیاه ضروری است در ارتباط دانست. بنابراین، در این گزارش تمرکز می‌کند، برروی درک نقش پیچیده‌ای که شیمی سطح نانولوله‌ها در پاسخ‌های فیزیولوژیکی و مولکولی گیاهان گوجه‌فرنگی بازی می‌کند. ما فرض کردیم که

خلوص، دانه بندی و وجود ویژگی‌های شیمیایی مختلف برروی دیوارهای خارجی از نانولوله‌های کربنی CNTs به‌طور قابل توجهی توانایی تعامل با سلول‌های گیاهی و تأثیر بیشتری بر روی نرخ جوانه‌زنی بذر داشته است.

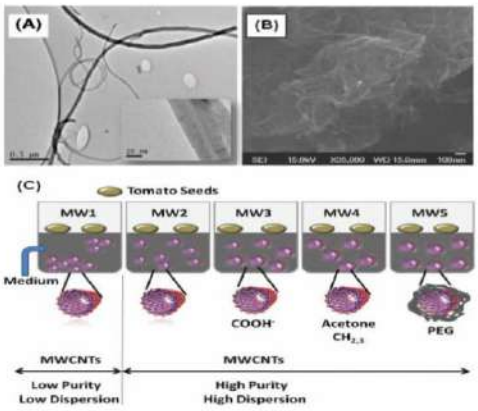
تحلیل نانولوله کربنی CNTs: نانولوله‌های کربنی(Carbon Nano Tubes) مورد استفاده در این مطالعه بر روی آهن-کبالت کاتالیزور $CaCO_3$ با نسبت وزن آهن / کبالت / $CaCO_3$ ۲.۵ :۲.۵ :۹۵ با استفاده از استیلن به عنوان منبع کربن در $720^{o}C$ تولید شد. خلوص در حدود ۸۰ درصد بود. تصاویر الکترونی TEM با بزرگنمایی کوچک و بزرگ نانولوله‌های کربنی CNTها در پانل A و B از شکل یک به ترتیب نشان داده شده است. تجزیه و تحلیل حرارتی (TGA) برای مشخص کردن درجه خلوص نانولوله خالص در سرعت جریان هوا از ۱۵۰ میلی‌لیتر / دقیقه انجام شد. اولین مشتق منحنی TGA تعیین دمای تجزیه نمونه، شکل C۱ نشان می‌دهد که مشخصات از دست دادن وزن از نانولوله‌های خالص، که در سرعت پنج درجه سانتی‌گراد / دقیقه از دمای $25^{o}C$ - $850^{o}C$ حرارت داده شدند. منحنی TGA نرمال و اولین مشتق شده از آن نشان می‌دهد یک قطره توده قابل توجهی در حدود $551^{o}C$، که مربوط به از دست دادن وزن به دلیل احتراق از نانولوله‌های کربنی CNTs بود. تجزیه و تحلیل کمی نشان داد که پس از تصفیه تک مرحله در هیدروکلراید، خلوص محصول نانولوله CNT بالاتر از ۹۸ درصد شد. طیف‌سنجی رامان به‌طور گسترده‌ای به تجزیه و تحلیل تبلور و توزیع قطر نانولوله استفاده می‌شود. طیف پراش رامان از نانولوله‌ها CNTs در آهن-کبالت / CaCO3 است که در شکل نشان داده طیف پراش رامان از CNTs در آهن-کبالت / CaCO3 است که در شکل D۱ نشان داده شده است. باندهای مشخصی در نانولوله‌ها بترتیب گروه D، گروه G و باند D۲ شکل گرفت.



تصویر۱

شکل دو نشان دهنده‌ی تجزیه و تحلیل میکروسکوپی از نانولوله خالص می‌باشد. میکروسکوپ الکترونی TEM و میکروسکوپ الکترونی پویشی (SEM) تصاویر (شکل یک B A) نشان دهنده‌ی حضور نانولوله با کیفیت بالا چند میکرومتر طول دارد. در گام بعدی، نانولوله با ویژگی‌های سطح‌های مختلف اصلاح شد، همانطور که در شکل C1 نشان داده شده است. بر اساس مشاهدات، تأثیر این پراکندگی و خلوص نانولوله‌ها در محیط توسعه گیاهان نیز مورد بررسی قرار گرفت. هدف اساسی این ارتباط بین پراکندگی نانولوله و اثر متقابل آن‌ها با گیاهان انتظار می‌رود برای انجام این کار، اول نمونه توسط یک مرحله شستشو در محلول رقیق اسیدهیدروکلریک با نسبت (۱:۱) در دمای اتاق جدا شدند و پس‌ازآن با آب یونیزه شده (DI) شسته تا زمانی که pH خنثی به‌دست آمد و خلوص کلی ۹۴

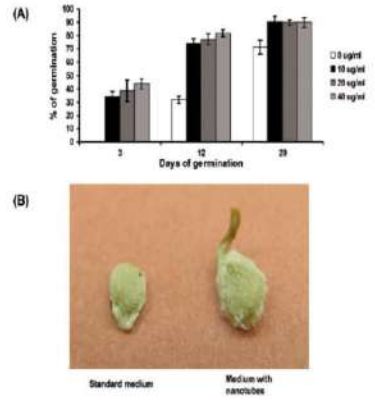
تصویر ۲



درصد بود. هنگامی که به محیط‌ها معرفی شدند، پراکندگی‌های پرتحرک مکانیکی ساده مشاهده شد، که منجر به شکل‌گیری آگلومره نانولوله با اندازه (۲-۲۰ میکرومتر) میکرومتر در محیط کشت می‌شود، که توسط میکروسکوپ نوری مشهود است. آگلومره نانولوله‌های کربنی CNTs در سراسر حجم محیط کشت قابل مشاهده بود. همانطور که توسط تجزیه و تحلیل عنصری تعیین می‌کند، بسیاری از ناخالصی‌های آهن، کبالت و کلسیم، همه‌ی آن‌ها که بخشی از سیستم کاتالیزوری برای رشد نانولوله‌ها بودند که به‌طور کامل در طول فرآیند تصفیه حذف نشدند. این نمونه نانولوله MW1 نامگذاری شد. سپس، نانولوله‌های مشابه علاوه‌براین با شستن HCl و سونیکیت رسیدن به درجه خلوص ۹۸ درصد خالص شدند و در محیط کشت‌های سونیکیت متفرق شدند، در نتیجه نانولوله‌های متفرق بسیار خوبی، بدون هیچ‌گونه تراکم قابل مشاهده در محیط کشت به وجود آمدند. این نمونه MW2 نامگذاری شد. نانولوله متشکل از نمونه MW2، اکسیده و تزئین شدند با گروه‌های کربوکسیلیک (قطب منفی قوی‌تر)، نمونه حاصل MW3 نامگذاری شد. به موازات، نانولوله MW2 به وسیله‌ی استون بارگذاری شدند که آن‌ها را به شدت آب‌گریز کرد با توجه به دکوراسیون $CH_{2,3}$ و گروه‌هایی که انرژی سطحی بسیار کم دارند باعث ایجاد یک قطب منفی بسیار کم در این نمونه مورد مطالعه شد، این نمونه MW4 نامگذاری کردند. در یک آزمایش جداگانه، نانولوله نمونه MW2 با پلی‌اتیلن گلیکول (PEG) پوشش داده شدند که به تولید پراکندگی نانولوله بسیار عالی انجامید. اما به دلیل حضور از پوشش پلیمری قطرش کمی افزایش پیدا کرد و قطبیت منفی کمی ایجاد کرد، نمونه حاصل MW5 نامگذاری شد (شکل۲).

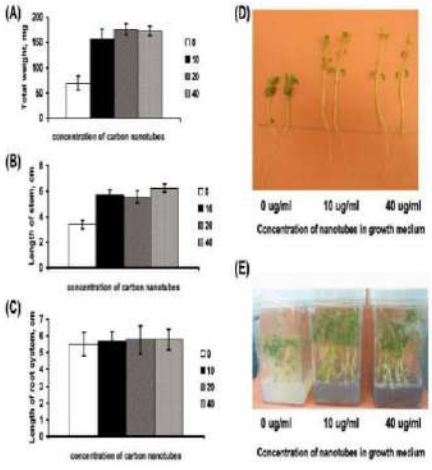
تأثیر نانولوله‌های کربنی بر نرخ جوانه‌زنی:

برای تست اینکه آیا نانولوله‌های کربنی ساخته شده، می‌توانند جوانه‌زنی و رشد گیاهچه را تحت‌تأثیر قرار دهند، بذر گوجه‌فرنگی استریل (رقم میکرو تام) در آگار استاندارد Murashige و اسکوگ (محیط کشت MS) همراه با غلظت‌های مختلف نانولوله‌های کربنی (۱۰، ۲۰، ۴۰ µg/mL) در سه تکرار ۵۰ بذری قرار دادند. محیط کشت MS بدون نانولوله‌ها CNTs برای آزمایش‌های کنترل مورد استفاده قرار گرفت. همانطور که در شکل۳ نشان داده شده است، با اضافه کردن نانولوله‌های کربنی به محیط کشت آگار باعث سرعت بخشیدن به روند جوانه‌زنی بذر و به‌طور قابل توجهی باعث کوتاه‌تر شدن زمان جوانه‌زنی می‌شود. بذر گوجه‌فرنگی قرار داده شده در محیط کشت با نانولوله جوانه‌زده در روز سوم، در حالی که بذرهای گوجه فرنگی قرار داده شده در محیط کشت MS بدون نانولوله‌ها بدون جوانه‌زنی بود. درصد نرخ جوانه‌زنی در طول روز بعد از اولین جوانه‌زنی به‌طور چشمگیری برای بذرهایی که با نانوذرات تحت درمان قرار گرفتند بیشتر بود. درصد جوانه‌زنی بذر که در محیط کشت



تصویر ۳

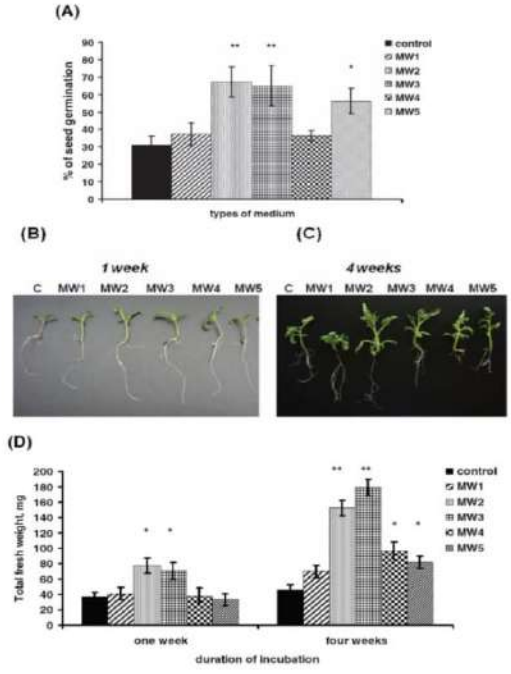
MS بدون نانولوله‌ها قرار داده شد در ۱۲ روز ۳۲ درصد و در ۲۰ روز ۷۱ درصد به‌طور متوسط جوانه‌زنی داشته است، درحالی که درصد جوانه از بذر قرار داده شده در محیط کشت حاوی نانولوله‌ها CNTs به طور متوسط در ۱۲ روز ۷۴-۸۲ درصد و ۹۰ درصد در ۲۰ روز بوده است. علاوه بر اثرات نانولوله بر رشد و توسعه گیاهچه جوانه‌زده در محیط کشت حاوی نانوذرات نیزمورد بررسی قرار گرفت (شکل ۴). گیاهچه گوجه‌فرنگی جوانه‌زده و در محیط کشت با غلظت‌های مختلف نانولوله‌های کربنی CNTs (۱۰، ۲۰، ۴۰ µg/mL) قرار گرفتند مشاهده کردند که باعث افزایش قابل توجهی در زیست‌توده (بیوماس) رویشی شد. وزن تر از زیست‌توده کل (برگ، ساقه، و ریشه) برای گیاهچه جوانه‌زده و رشد یافته در محیط کشت حاوی نانو لوله‌های کربنی CNTs در مقایسه با گیاهچه توسعه یافته در محیط کشت استاندارد (کنترل) افزایش ۲.۵ برابر داشته است. گیاهچه گوجه‌فرنگی در معرض نانولوله CNT، ساقه و برگ توسعه یافته‌تر داشت، اما طول سیستم ریشه نسبت به شاهد (CNTها درمان نشده) تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل ۴). پیش‌ازاین، گزارش‌های محدودی در ارتباط با اثرات مثبت و منفی از نانوذرات مختلف در فیزیولوژی گیاهان شده است. در مطالعاتی نشان داد که درمان با نانو TiO_2 در غلظت مناسب، سرعت جوانه‌زنی بذر اسفناج و قدرت آن را افزایش می‌دهد. به‌تازگی، لین و زینگ برای مشخص کردن سمیت نانوذرات، پنج نوع از نانوذرات در غلظت ۲۰۰۰ میلی‌گرم / لیتر با استفاده از شش گونه‌ی گیاهی مورد بررسی قرار دادند، آن‌ها دریافتند که نرخ جوانه‌زنی بذر از تمام گونه‌های گیاهی تست شده توسط انواع مختلف نانوذرات جز بذر چچم و ذرت تحت درمان با ذرات نانو روی قرار نگرفت. در این مورد، اثرات مهار نانو روی ثبت شد. این داده‌های تجربی نشان می‌دهد که اثرات نانو مواد بر رشد و توسعه گیاه وابسته به نوع نانوذرات هستند، غلظت، گونه‌های گیاهی و شرایط خاصی از آزمایش‌ها از جمله به روش جذب نانوذرات به موجودات گیاهی بستگی دارد. علاوه‌براین، برخی از نویسندگان نشان دادند که اندازه و سطح مخصوص ویژگی ممکن است نقش مهمی در phytotoxicity نانوذرات بازی کند. Canaas و همکاران، اخیراً گزارش دادند که استفاده از نانولوله‌های کربنی منجر به مهار افزایش طول ریشه در گوجه‌فرنگی و افزایش ازدیاد طول ریشه در پیاز و خیار می‌شود. در مقابل با این مشاهدات، نتایج ما (شکل 4D) هیچ اثر سمی از نانولوله CNTs در توسعه ریشه و افزایش طول ریشه گیاهچه گوجه‌فرنگی، حداقل در محدوده که مورد استفاده قرار گرفت، نشان نداد (شکل ۴).



تصویر ۴

برای تعیین پاسخ‌های فیزیولوژیکی گیاهان در استفاده از نانولوله‌های کربنی با خواص سطحی و سطح تراکم، جوانه‌زنی و رشد گیاهان گوجه‌فرنگی از دانه‌های جوانه‌زده و رشد گیاهان در محیط کشت (MS) همراه با پنج نوع از نانولوله سنجش قرار گرفت (شکل ۵). ما یک همبستگی قوی بین پاسخ‌های فیزیولوژیک گیاهان و ویژگی‌های شیمیایی سطح نانولوله‌های کربنی CNTs، و همچنین پراکندگی / خلوص نانولوله‌ها پیدا کردیم. یافته‌های ما افزایش قابل توجهی در میزان جوانه‌زنی ($P < 0.001$) در دانه در معرض نمونه MW2 و

MW3، که به خوبی نشان دهنده‌ی پراکنده و دارای قطب منفی سطحی قوی است. جوانه‌زنی بذرهای در معرض نمونه MW5 افزایش یافته است، با توجه به این واقعیت که PEG باعث سمیت کم و پراکندگی خوب از نانولوله‌ها منجر شده است. جالب توجه است که سرعت جوانه‌زنی برای نمونه MW2 در مقایسه با MW1 بیشتر بود(شکل 5A). این را نمی‌توان رد کرد که حضور نانوذرات فلزی (آهن، کبالت، و یا اکسیدهای آن‌ها) که به‌طور کامل، در نمونه MW1 حذف نشده بودند (نمونه ناخالص و با پراکندگی کم) می‌تواند اثر سمی در فرآیند جوانه‌زنی داشته باشد. تعدادی از مطالعات دیگر بروز اثرات سمی در چندین گیاه که به علت قرار گرفتن در معرض انواع نانوذرات اکسید فلزی / فلز نشان داده اند(Rico at el 2011). همچنین، این واقعیت است که نانولوله‌های فشرده و شکل گرفته نسبتاً بزرگتر از ظرفیت خود هستند و تأثیرشان بر سیستم‌های گیاهی کاهش یافته است و در نتیجه بر واکنش‌های فیزیولوژیکی گیاهان تأثیر داشته است. در نتیجه، فرض بر این است که، برای نمونه MW1، عدم افزایش زیست‌توده (بیوماس) را می‌توان بر اساس تراکم از نانولوله‌ها و احتمالاً حضور ناخالصی‌های فلزی توضیح داد. روند مشابه برای توسعه گیاهچه گوجه‌فرنگی جوانه‌زده در محیط حاوی نانولوله مشاهده شد (شکل 5B-D). گیاهان گوجه‌فرنگی رشد کرده در محیط کشت حاوی MW2 و MW3 به نمایش گذاشته رشد فعال‌تری در مقایسه با گیاهان در معرض انواع دیگری از نانولوله‌های و تیمار کنترل داشتند. گیاهان در محیط کشت حاوی MW1 تفاوت معنی‌داری در رشد در مقایسه با گیاهان رشد کرده در محیط کشت بدون نانولوله‌ها (گروه شاهد) را نشان نمی‌دهد. پس از چهار هفته از قرار گرفتن در معرض گیاهان گوجه‌فرنگی به انواع مختلف نانولوله‌ها، بیوماس کل از گیاهان در معرض MW2 و MW3 دو برابر از گیاهان شاهد بود(شکل 5C-D). افزایش معنی‌داری اما بسیار پایین‌تر است ($P < 0.05$) در زیست‌توده برای گیاهان در معرض MW4 و MW5 در مقایسه با گیاهان شاهد و گیاهان در معرض MW1 ثبت شد. جالب توجه است، گیاهان در معرض نانولوله‌ها تحت درمان با استون (MW4) نرخ توسعه بسیار پایین‌تر در مقایسه با گیاهان در معرض MW2 و MW3، که می‌تواند با ویژگی سطح آب‌گریز از نانولوله‌های تزئین شده با استون و گروه‌های عملکردی کم انرژی $CH_{2,3}$ توضیح داد (Zeng at el, 2011). این یافته‌ها تنوع تقریباً خطی از زیست‌توده (بیوماس) در گیاهان در معرض گونه‌های مختلف از نانولوله نسبت به کنترل و مقادیر بار سطحی منفی از نمونه‌های نانولوله‌های مربوط در آزمایش داشته است. با توجه به تنوع در پراکندگی، نمونه MW1 در این مطالعات درنظر گرفته نشده است. دریافتند که نانولوله‌ها با بار منفی بیشتر، باعث افزایش قابل توجهی بیشتری در زیست‌توده (بیوماس) از گیاهان در معرض نانولوله‌ها بعد از هر یک و چهار هفته شده است. این یافته‌ها به روشنی ارتباط بین قطب سطح نانولوله‌های کربنی و پاسخ‌های فیزیولوژیک ناشی از گیاهان نشان می‌دهد.



تصویر ۵

منابع:

Canas, J. E.; Long, M.; Nations, S.; Vadan, R.; Dai, L.; Luo, M.; Ambikapathi, R.; Lee, E. H.; Olszyk, D. (2008). Effects of Functionalized and Nonfunctionalized Single-Walled Carbon Nanotubes on Root Elongation of Select Crop Species. *Environ. Toxicol. Chem.*, *27*, 1922–1931.

Chinnamuthu, C. R.; Murugesa Boopathi, P. (2009). Nanotechnology and Agroecosystem, Madras Agricultural Journal., 96: 17-31.

Joe, E. K.; Wei, X.; Anderson, R. R.; Lin, C. P. (2003). Selective Cell Targeting with Light-Absorbing Microparticles and Nanoparticles. Biophys. J., 84, 4023–4032.

Zharov, V. P.; Galitovskaya, E. N.; Jonson, C.; Kelly, T. (2005). Synergistic Enhancement of elective Nanophotothermolysis with Gold Nanoclusters: Potential for Cancer Therapy. Laser Surg. Med., 37, 219–226.

Khodakovskaya, M.; Dervishi, E.; Mahmood, M.; Yang, X.; Li, Z.; Fumiya, W.; Biris A. S. (2009). Carbon Nanotubes Are Able To Penetrate Plant Seed Coat and Dramatically Affect Seed Germination and Plant Growth. ACS Nano., 3, 3221 – 3227.

Villagarcia, H.; Dervishi, E.; Silva, K.; Biris, A.; Khodakovskaya, M. (2012). Surface Chemistry of Carbon Nanotubes Impacts the Growth and Expression of Water Channel Protein in Tomato Plants., 8, No. 15, 2328–2334.