

## تغییر پاسخ‌های مورفوفیزیولوژی به‌لیمو (*Lippia citriodora*) به غلظت‌های مختلف نانولوله کربنی تک جداره و چند جداره

عطیه اورعی\*<sup>۱</sup> و تکتیم اورعی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> گروه علوم گیاهی، گیاهان دارویی، مؤسسه آموزش عالی اقبال لاهوری، مشهد، ایران

<sup>۲</sup> علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

### چکیده

به‌لیمو (*Lippia citriodora*) یکی از گیاهان دارویی ارزشمند با کاربرد گسترده در صنایع غذایی، دارویی و آرایشی است که به دلیل دارا بودن متابولیت‌های ثانویه‌ای مانند فنول‌ها، فلاونوئیدها و اسانس‌های معطر، توجه زیادی را به خود جلب کرده است. به‌کارگیری نانولوله‌های کربنی در سال‌های اخیر به‌عنوان رویکردی نوین در بهبود رشد و افزایش ترکیبات دارویی گیاهان مورد توجه قرار گرفته است. در این پژوهش تأثیر غلظت‌های مختلف نانولوله‌های کربنی تک‌جداره و چندجداره (صفر، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ گرم) بر پاسخ‌های فیزیولوژیک و مورفولوژیک گیاه به‌لیمو در شرایط گلخانه‌ای بررسی شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و تیمارهای مختلف نانولوله‌ها به صورت محلول‌پاشی برگ انجام گرفت. نتایج نشان داد صفات تحت تأثیر اثرات ساده غلظت نانولوله‌های کربنی قرار گرفتند. تیمار ۲ گرم نانولوله کربنی به‌طور معنی‌داری موجب افزایش پرولین (۷۰ درصد)، فنل (۱۹ درصد)، کلروفیل کل (۵۸ درصد) نسبت به شاهد شد. با افزایش غلظت نانولوله‌های کربنی همراه با کاهش میزان مالون دی‌آلدئید، در فعالیت آنزیم‌ها روندی صعودی مشاهده شد، به‌نحوی که بیشترین فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (۲/۰۶۷ میکرومول بر گرم وزن تر)، پراکسیداز (۱/۱۵ میکرومول بر گرم وزن تر)، آسکوربات پراکسیداز (۲۷/۰۸ میکرومول بر گرم وزن تر)، و کاتالاز (۳/۵۷ میکرومول بر گرم وزن تر) در تیمار ۲ گرم نانولوله کربنی به ثبت رسید. همچنین شاخص‌های رشدی نظیر وزن خشک اندام هوایی و زیر زمینی تحت تأثیر مثبت غلظت‌های بیشتر نانولوله‌های کربنی قرار گرفت. بهترین درصد اسانس در تیمار ۲ گرم (۱/۰۱۷ درصد) به ثبت رسید. به‌طور کلی، استفاده از نانولوله‌های کربنی چندجداره به دلیل صرفه اقتصادی با غلظت ۲ گرم می‌تواند به‌عنوان ابزاری مؤثر در بهبود رشد و درصد اسانس گیاه به‌لیمو معرفی شود.

واژه‌های کلیدی: الیستور، گیاهان دارویی، متابولیت‌های ثانویه، نانوتیوب کربنی

دریافت مقاله: ۱۴۰۴/۰۷/۱۸، بازنگری: ۱۴۰۴/۰۹/۱۸، پذیرش: ۱۴۰۴/۰۹/۲۵، اولین انتشار: ۱۴۰۵/۰۳/۱۲

\* نویسنده مسئول، رایانامه: a.oraee@eqbal.ac.ir



حق انتشار این مستند، متعلق به انجمن فیزیولوژی گیاهی ایران است. © ۱۴۰۳

این مقاله تحت گواهی زیر منتشر شده و هر نوع استفاده غیرتجاری از آن مشروط بر استناد صحیح به مقاله و با رعایت شرایط مندرج در آدرس زیر مجاز است:

Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

## مقدمه

گیاه دارویی به‌لیمو (*Lippia citriodora*)، که معمولاً با نام *Lemon verbena* شناخته می‌شود، از خانواده Verbenaceae بوده و بومی آمریکای جنوبی است. گرچه امروزه در مناطق مختلفی مانند جنوب اروپا، خاورمیانه و ایران کشت می‌شود (Bahramsoltani et al., 2018). این گیاه به‌دلیل ترکیبات معطر و متابولیت‌های فعال، از دیرباز در طب سنتی به‌عنوان درمانی برای اختلالات گوارشی، اضطراب، بی‌خوابی، و بهبود عملکرد عصبی مورد استفاده قرار گرفته است (Pascual et al., 2001). به‌لیمو حاوی ترکیباتی مانند ورباسکوزید (Verbascoside)، فلاونوئیدها مانند نارنجین و سیریسیماریتین، و عناصر معطر روغنی مانند سیترال، ژرانیول و نرول است که هر یک نقش‌های زیستی-فارماکولوژیک مهمی دارند (Ombito et al., 2014).

ورباسکوزید از گروه فنل پروپانوئیدها بوده و خواص ضداکسیدانی، ضدالتهابی، ضد میکروبی و آرام‌بخش قوی دارد (Quirantes-Pine et al., 2013; Alipieva et al., 2014). در مطالعات آزمایشگاهی، اثربخشی قابل‌توجه آن در مهار باکتری‌هایی مانند *Staphylococcus aureus* ثبت شده است. همچنین برخی یافته‌ها نشان می‌دهند که عصاره‌های حاوی ورباسکوزید ممکن است در برابر باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها اثربخش باشند، به‌ویژه زمانی که همراه با داروهای معمول ترکیب می‌شوند (Marcetic et al., 2025). همان‌طور که گفته شد، ورباسکوزید نقش برجسته‌ای در فعالیت‌های زیستی ایفا می‌کند، این مولکول فنولی، ساختاری پلی‌فنولی دارد که قابلیت مهار رادیکال‌های آزاد و کاهش التهاب را پیش می‌برد (Alipieva et al., 2014). علاوه بر آن، ترکیبات روغن معطر مانند سیترال، نرول و ژرانیول نیز با خصوصیات آنتی‌میکروبی و محافظت از پوست مرتبط‌اند. فلاونوئیدهایی مثل نارنجین و سیریسیماریتین نیز به‌طور مکرر به‌عنوان مارکرهای شیمیایی در گونه‌های مختلف *Lippia* گزارش شده‌اند (Ombito et al., 2014). در طب سنتی، دمنوش برگ به‌لیمو به‌عنوان آرام‌بخش اعصاب، کاهش‌دهنده

اضطراب و کمک‌کننده خواب مصرف می‌شود. در مطالعات بالینی اولیه، مصرف عصاره به‌لیمو در افراد مبتلا به هایپرکلسترولمی موجب کاهش کلسترول و بهبود شاخص‌های اکسیداتیو خون، بدون بروز عوارض جانبی جدی گردید (Angiolillo et al., 2021). این نتایج نشان‌دهنده پتانسیل ایمن بیماری‌زایی پایین و تأثیرات مثبت سیستمیک این گیاه است. با توجه به خواص فیزیولوژیکی و دارویی به‌لیمو، کاربردهای آن در حوزه‌های درمانی و غذایی گسترده است. فراتر از مصرف خوراکی و درمان‌های سنتی، امروزه استخراج عصاره و اسانس این گیاه مورد توجه صنعت داروسازی و آرایشی قرار دارد، به‌ویژه به‌دلیل ویژگی‌های ضدالتهابی، ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات که در کرم‌ها، لوسیون‌ها و محصولات محافظتی پوست کاربرد دارند (Nobilae et al., 2024).

متابولیت‌های زیست‌فعال شامل ترکیبات اولیه و تخصصی هستند که تأثیر مثبتی بر سلامت انسان دارند. این ترکیبات دارای ارزش اقتصادی و تغذیه‌ای دارند. در این راستا، افزایش اخیر در مصرف گیاهان دارویی، تحقیقات در مورد افزایش محتوای بالای مواد مغذی در گیاهان را به پیش برده است (Ku et al., 2020). چندین محرک برون‌زا و درون‌زا برای افزایش سنتز متابولیت‌های زیست‌فعال در گیاهان، مانند تنش سرما و آب، نور، UV و هورمون‌های گیاهی استفاده شده‌اند (Munchinger et al., 2023; Yeshi et al., 2022). بنابراین، استفاده از فناوری‌هایی که بتوانند کیفیت متابولیت‌های گیاهان را بدون آسیب رساندن به عملکرد آنها بهبود بخشند، بسیار مهم است (Ioannou et al., 2020). افزایش محتوای ترکیبات زیست‌فعال در گیاهان نه تنها پیامدهایی برای سلامت انسان دارد، بلکه می‌تواند به سازگاری گیاهان نیز کمک کند، زیرا در کشاورزی، ترکیبات فعال به‌عنوان محرک‌های زیستی در سازگاری و بقای گیاهان با شرایط نامساعد محیطی عمل می‌کنند (Yeshi et al., 2022).

در سال‌های اخیر، نانوذرات کربنی به‌ویژه نانولوله‌های کربنی به‌عنوان ابزاری نوین در کشاورزی و علوم گیاهی مطرح

شده‌اند (Khodakovskaya et al., 2009). این نانومواد به دلیل ویژگی‌هایی چون سطح ویژه بالا، پایداری شیمیایی، و توانایی نفوذ به دیواره سلولی گیاهان، قادرند بر فرآیندهای فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی تأثیرگذار باشند (Liu et al., 2010). مطالعات نشان داده‌اند که کاربرد نانولوله‌ها می‌تواند جوانه‌زنی بذر را در چندین گونه جنگلی مانند چای لابرادور (*Rhododendron groenlandicum* L.) و توس (*Betula pumila* L.) بهبود بخشد (Ali et al., 2020). این اثرات اغلب به بهبود جذب آب و مواد غذایی، تغییر در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و تعدیل مکانیسم‌های دفاعی گیاه نسبت داده می‌شوند (Zaytseva and Neumann, 2016). با این حال، شواهدی نیز مبنی بر اثرات منفی و حتی سمی بودن نانولوله‌های کربنی چندجداره multiwall carbon nanotubes (MWCNTs) در گیاهان گزارش شده است. برخی مطالعات نشان داده‌اند که غلظت‌های بالای این نانومواد می‌تواند باعث اختلال در تقسیم سلولی، کاهش رشد، تغییرات متابولیکی و حتی آسیب به ساختار DNA شوند (Begum et al., 2014). این یافته‌ها نشان می‌دهد که پاسخ گیاهان به نانولوله‌ها، بسته به گونه گیاهی، شرایط محیطی، غلظت مورد استفاده و ویژگی‌های نانوذره متفاوت است (Vithanage et al., 2017).

پوریرامی هیر و همکاران (۱۴۰۲) نشان دادند که کاربرد ۹۰ میلی‌گرم در لیتر نانولوله کربنی سبب افزایش سطح برگ و وزن گیاه رزماری شد. همچنین اثر مثبت نانولوله‌های کربنی بر خصوصیات فلفل نظیر وزن تر و خشک، ارتفاع، تعداد گل و میوه تحت تنش خشکی ۷۵ درصد ظرفیت زراعی به اثبات رسید (Ahmadi et al., 2024). نانولوله‌های کربنی می‌توانند نرخ رشد را در همه بخش‌های گیاه نخود (*Cicer arietinum*) از جمله ریشه و ساقه افزایش دهند. Canas و همکاران (۲۰۰۸) گزارش دادند که نانولوله‌های کربنی تک جداره به طور قابل توجهی مانع رشد طولی ریشه گوجه‌فرنگی و کلم می‌شوند، اما طول ریشه را در پیاز و خیار افزایش می‌دهند. اثرات نانولوله‌های کربنی بسته به گونه گیاهی متفاوت است زیرا در گیاه پسته استفاده از ۱۰ میلی‌گرم در لیتر میزان

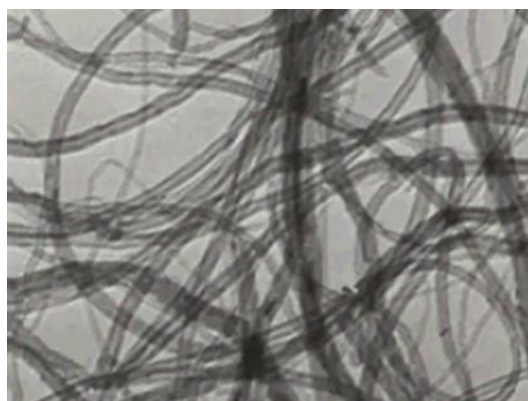
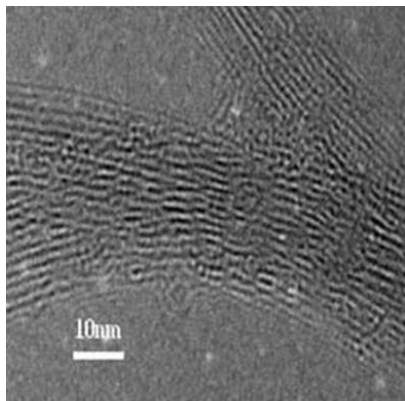
#### مواد و روش‌ها

**شرایط آزمایش و مواد گیاهی:** این آزمایش در شرایط گلخانه‌ای در مؤسسه آموزش عالی اقبال لاهوری مشهد در بهار سال ۱۴۰۳ اجرا شد. ماده گیاهی شامل قلمه‌های ریشه‌دار به‌لیمو بود. قلمه‌ها در گلدان‌های ۴ لیتری حاوی ۳/۳ کیلوگرم بستر کشت (کوکوپیت و پرلیت) قرار گرفت. به منظور تغذیه از محلول هوگلند استفاده شد و دو ماه پس از استقرار کامل قلمه‌ها، گلدان‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی چیده شد. هر گیاه به‌عنوان یک واحد آزمایشی در نظر گرفته شد و هر تیمار دارای سه تکرار بود.

**تیمارهای نانولوله‌های کربنی:** در این آزمایش از نانولوله‌های کربنی چندجداره (MWCNTs) و نانولوله‌های کربنی تک‌جداره (SWCNTs) به‌عنوان تیمار استفاده شد (جدول ۱). این نانولوله‌ها از شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان (مشهد) تهیه گردید. از غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰، ۸۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانولوله‌ها استفاده شد (Prakash et al., 2025). حجم نهایی محلول پاشیده‌شده برای هر گیاه ۲/۵ میلی‌لیتر بود که معادل ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ گرم نانولوله بود. برای آماده‌سازی محلول‌ها، سوسپانسیون نانولوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در آب‌مقطر خیسانده و سپس در حمام اولتراسونیک (فرکانس ۲۵ کیلوهرتز، دمای ۷۰ درجه

## جدول ۱- خصوصیات نانولوله‌های کربنی چندجداره و تک‌جداره

مشخصات نانولوله کربنی چندجداره (SWCNTs)	مشخصات نانولوله کربنی چندجداره: ۲۰-۳۰ نانومتر (NWCNTs)
خلوص: نانولوله‌های کربنی ۹۸ >	خلوص ۹۵٪
درصد وزنی نانولوله‌های تک‌جداره ۹۸ > درصد وزنی	درصد وزنی (نانولوله‌های کربنی (۹۷٪ درصد وزنی محتوای کربن)
قطر خارجی: ۱-۲ نانومتر	مساحت سطح ویژه نانو پودر: ۱۱۰ مترمربع بر گرم
قطر داخلی: ۰/۸-۱/۶ نانومتر	رنگ نانو پودر لوله کربنی: مشکی رنگ
قطر متوسط: ۱/۱ نانومتر	قطر خارجی نانولوله‌های کربنی: ۲۰-۳۰ نانومتر
طول: ۳۰-۵ میکرون (TEM)	قطر داخلی نانولوله چند جداره: ۵-۱۰ نانومتر
مساحت سطح ویژه ۶۵۰ >: مترمربع در گرم (BET)	طول نانولوله‌های کربنی: ۳۰-۱۰ میکرومتر
چگالی بالک (توده‌ای): ۰/۰۸ گرم بر سانتی‌متر مکعب	رسانایی الکتریکی نانولوله کربنی: ۱۰۰ زیمنس بر سانتی‌متر
چگالی حقیقی (ذره‌ای): ۲/۱ گرم بر سانتی‌متر مکعب	چگالی بالک (چگالی توده‌ای) نانو پودر: ۰/۲۸ گرم بر سانتی‌متر مکعب
هدایت الکتریکی: ۱۰۰ زیمنس بر سانتی‌متر	چگالی حقیقی (چگالی ذره‌ای) نانوذرات لوله کربنی: ۲/۱ گرم بر سانتی‌متر مکعب
هدایت حرارتی: ۲۰۰-۵۰ وات بر متر مکعب	
رنگ: مشکی	
دمای اشتعال: ۶۳۰ درجه سانتی‌گراد	
روش ساخت CVD: انباشت بخار شیمیایی	



TEM: Transmission electron microscopy, BET: Brunauer -emmett - teller surface area analysis, CVD: Chemical vapor deposition

محلول‌پاشی ۲۰ روز پس از انتقال قلمه‌ها انجام شد. حجم نهایی محلول پاشیده‌شده برای هر گیاه ۲/۵ میلی‌لیتر بود که معادل ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ گرم نانولوله بود. در تیمار شاهد، گیاهان تنها با آب‌مقطر تقطیر محلول‌پاشی شدند. انتخاب غلظت‌های آزمایشی براساس گزارش‌های پیشین در زمینه استفاده از نانومواد کربنی برای بهبود رشد و افزایش محتوای متابولیت‌های ثانویه در گیاهان انجام شد (Prakash *et al.*, 2025).

سانتی‌گراد) به مدت ۵۰ دقیقه قرار گرفت هر پنج دقیقه دستگاہ متوقف شد تا از افزایش بیش از حد دما و تشکیل کف جلوگیری شود. پس از فرآیند اولتراسونیک، محلول حاصل با دور ۲۰۰۰ rpm به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و سوپرناتانت شفاف حاوی نانوذرات یکنواخت به‌عنوان محلول نهایی مورد استفاده قرار گرفت (Hatami, 2017).

**اعمال تیمار:** در مرحله توسعه رویشی قلمه‌ها، تیمارهای نانولوله کربنی به‌صورت محلول‌پاشی اعمال شدند. نخستین

برای ارزیابی تغییرات رشدی و مورفولوژیک، پس از برداشت گیاهان، وزن تر و خشک بخش‌های هوایی و ریشه ثبت گردید. نمونه‌ها ابتدا به دقت شسته شده، سپس وزن تر ثبت و برای تعیین وزن خشک در آون ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت خشک شدند. حجم ریشه به روش جابجایی آب اندازه‌گیری شد. در نهایت، برای اندازه‌گیری محتوای اسانس، برگ‌های خشک‌شده در دستگاه کلونجر به مدت سه ساعت تقطیر آبی شدند و بازده اسانس به‌صورت درصد محاسبه گردید (Fitsiou *et al.*, 2018).

داده‌های حاصل از آزمایش با نرم‌افزار آماری Mini Tab (نسخه ۱۷) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مقایسه میانگین تیمارها با آزمون توکی در سطح ۵ درصد انجام گردید. ترسیم نمودارها نیز با نرم‌افزار Excel 2019 صورت پذیرفت.

### نتایج و بحث

**پرویلین:** با توجه به نتایج جدول تجزیه واریانس (جدول ۲) غلظت نانولوله‌های به کار رفته برای پرویلین، در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد. همچنین با توجه به جدول مقایسه میانگین (جدول ۳)، نتایج نشان داد که با افزایش غلظت نانولوله‌ها، پرویلین به‌طور قابل توجهی افزایش یافت. با افزایش غلظت از صفر به ۲ گرم میزان پرویلین از ۵/۰۲۵ به ۸/۵۷۲ میلی‌گرم بر گرم وزن تر افزایش یافت که نشان از افزایش ۵۷ درصدی این صفت در مقابل گیاهان شاهد است. بیشترین میزان پرویلین در غلظت‌های ۱/۵ و ۲ گرم نانولوله مشاهده شد. پرویلین یک اسمولیت سازگار و آنتی‌اکسیدان غیرآزیمی است که در تعدیل فشار اسمزی، پایدارسازی پروتئین‌ها و غشا، و تنظیم پیام‌رسانی ROS نقش دارد، بنابراین تغییرات آن شاخصی از وضعیت تنش/سیگنالینگ ردوکس در گیاه است. در بسیاری از شرایط، افزایش ROS باعث القای بیوستز پرویلین (مثلاً از مسیر P5CS) می‌شود و پرویلین نیز متقابلاً در پاکسازی ROS و تنظیم شبکه سیگنالینگ مشارکت می‌کند (Renzetti *et al.*, 2024). با توجه به این چارچوب، کاهش پرویلین در غلظت‌های پایین تا میانی نانولوله‌ها می‌تواند بیانگر

**برداشت نمونه‌ها:** دو ماه پس از اعمال تیمار، برگ‌های کامل و توسعه‌یافته از گیاهان برداشت شدند. نمونه‌های برداشت‌شده بلافاصله برای سنجش ویژگی‌های مورفولوژیک و فیزیولوژیک به آزمایشگاه منتقل و مطابق روش‌های استاندارد آماده‌سازی و اندازه‌گیری شدند.

**اندازه‌گیری صفات فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و مورفولوژیک:** به‌منظور بررسی اثر نانولوله‌های کربنی، مجموعه‌ای از صفات فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و مورفولوژیک در گیاه به‌لیمو ارزیابی شد. برای تعیین مقدار پرویلین، از روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) استفاده شد. محتوای فنل کل برگ‌ها به روش فولین-سیوکالتیو (Singleton and Rossi, 1965) و براساس منحنی استاندارد گالیک اسید اندازه‌گیری گردید. برای تعیین میزان پراکسیداسیون لیپیدها و غلظت مالون دی‌آلدئید (MDA)، از روش Heath و Packer (۱۹۶۸) استفاده شد که در آن ترکیب MDA با اسید تیوباربتوریک واکنش داده و جذب در طول‌موج‌های ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر خوانده گردید. مقدار کلروفیل a, b و کل نیز به روش Arnon (۱۹۴۹) با استفاده از حلال استون ۸۰ درصد استخراج و جذب در طول‌موج‌های ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر سنجیده شد.

به‌منظور بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، استخراج پروتئین خام از نمونه‌های تازه برگ انجام شد و فعالیت آنزیم‌ها با روش‌های استاندارد اندازه‌گیری گردید. فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD) براساس توانایی این آنزیم در جلوگیری از احیای نیتروبلو تترازولیوم (NBT) توسط سوپراکسید انجام شد (Beauchamp and Fridovich, 1971). فعالیت پراکسیداز (POD) با استفاده از تجزیه پراکسید هیدروژن در حضور گایاکول و سنجش تغییرات جذب در ۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Chance and Maehly, 1955). فعالیت کاتالاز (CAT) براساس روش Aebi (۱۹۸۴) و با بررسی کاهش جذب محلول  $H_2O_2$  در طول‌موج ۲۴۰ نانومتر تعیین گردید. همچنین فعالیت آسکوربات پراکسیداز (APX) با روش Nakano و Asada (۱۹۸۱) و طریق اندازه‌گیری کاهش جذب آسکوربات در ۲۹۰ نانومتر سنجیده شد.

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس تأثیر غلظت و نوع نانولوله‌های تک‌جداره و چندجداره بر صفات فیزیولوژیکی گیاه به لیمو

منابع تغییرات	درجه آزادی	پرویلین	فنول	مالون دی‌آلدئید	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	اسانس
نوع نانولوله	۱	۰/۰۰۲۹ ns	۰/۳۰۳ ns	۰/۰۰۰۱ ns	۰/۰۱۷ ns	۰/۰۰۹ ns	۰/۰۵۱ ns	۰/۰۰۱ ns
غلظت	۵	۱۱/۰۷۲۸**	۸/۱۰۱**	۰/۰۴**	۰/۴۹۷**	۴/۶۲۳**	۸/۰۷۴**	۰/۰۴۲**
نانولوله × غلظت	۵	۰/۰۰۰۶ ns	۰/۱۱۶ ns	۰/۰۰۱ ns	۰/۰۴۶ ns	۰/۲۸۴ ns	۰/۴۸۸ ns	۰/۰۰۱ ns
خطا	۲۴	۰/۰۰۳۵	۰/۰۴۶	۰/۰۰۳۴	۰/۰۳۸	۰/۰۹۱	۰/۱۹۴	۰/۰۰۱
C.V. %		۰/۷۶۲	۱/۲۸۱	۱۳/۲۱۸	۱۱/۴۰۱	۵/۸۲۴	۶/۳۸۵	۵/۴۰۴

ns, \*\*, \*\*\* به ترتیب در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و عدم معنی‌داری

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف نانولوله‌های کربنی بر صفات فیزیولوژیکی گیاه به لیمو

غلظت نانولوله‌ها (گرم)	پرویلین (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)	فنول (میکروگرم بر گرم وزن خشک)	مالون دی‌آلدئید (نانومول گرم بر وزن تر)	کلروفیل a (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)	کلروفیل b (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)	کلروفیل کل (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)
شاهد	۵/۰۲۵ <sup>d</sup>	۱۵/۰۵ <sup>c</sup>	۰/۴۵ <sup>a</sup>	۱/۲۵۳ <sup>d</sup>	۳/۸۲۴ <sup>c</sup>	۵/۰۷۸ <sup>c</sup>
۰/۲۵	۸/۲۰۷ <sup>b</sup>	۱۷/۱۸۳ <sup>b</sup>	۰/۲۹۲ <sup>bc</sup>	۱/۶۴۵ <sup>bc</sup>	۵/۱۶۷ <sup>b</sup>	۶/۸۱۲ <sup>b</sup>
۰/۵	۸/۲۸۵ <sup>b</sup>	۱۷/۲۵ <sup>b</sup>	۰/۲۶۷ <sup>c</sup>	۲/۰۴۶ <sup>a</sup>	۶/۲۱۹ <sup>a</sup>	۸/۲۶۵ <sup>a</sup>
۱	۸/۰۱۷ <sup>c</sup>	۱۵/۳۶۷ <sup>c</sup>	۰/۲۳۳ <sup>c</sup>	۱/۵۶۴ <sup>cd</sup>	۴/۹۱۴ <sup>b</sup>	۶/۴۷۸ <sup>b</sup>
۱/۵	۸/۵ <sup>a</sup>	۱۷/۳۵۸ <sup>b</sup>	۰/۲۹ <sup>bc</sup>	۱/۷۴۲ <sup>abc</sup>	۴/۹۳۶ <sup>b</sup>	۶/۶۷۸ <sup>b</sup>
۲	۸/۵۷۳ <sup>a</sup>	۱۷/۸۳۳ <sup>a</sup>	۰/۳۸۳ <sup>ab</sup>	۱/۹۶۷ <sup>ab</sup>	۶/۰۷۷ <sup>a</sup>	۸/۰۴۴ <sup>a</sup>

میانگین‌های دارای حروف مشابه براساس آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

است (Shekhawat et al., 2021).

**فنول کل:** میزان فنول تحت تأثیر اثرات متقابل نوع نانوله و غلظت قرار نگرفت و میزان غلظت نانوله کربنی در سطح یک درصد میزان فنول را تحت تأثیر قرار داد (جدول ۲). نتایج حاصل از جدول مقایسه میانگین نشان داد که با افزایش غلظت نانولوله‌ها از شاهد به ۲ گرم، مقدار فنول کل به طور معنی‌داری افزایش یافت. کمترین مقدار فنول در گیاهان شاهد مشاهده شد. همچنین بیشترین مقدار فنول، در غلظت ۲ گرم ثبت شد که نسبت به شاهد ۱۸/۴۹ درصد افزایش داشت (جدول ۳). فنل‌ها از مهم‌ترین متابولیت‌های ثانویه در گیاهان هستند که نقش اساسی در خثی‌سازی گونه‌های فعال اکسیژن، حفاظت از غشاها و افزایش مقاومت گیاه در برابر تنش‌های محیطی دارند. در این مطالعه، مشاهده شد که با افزایش غلظت نانوله‌های

تعدیل ردوکس توسط نانولوله‌ها باشد، درحالی‌که افزایش شدید در غلظت ۲ گرم احتمالاً به اثر بازدارنده/ فیتوتوکسیسیته یا برهم‌زدن سوخت‌وساز اسیدهای آمینه و تعادل ردوکس اشاره دارد. چنین الگوی دوگانه‌ای (تنظیم مفید در دوزهای پایین، و کاهش کارکرد در دوزهای بالا) با درک کنونی از نقش دوگانه ROS و پرویلین در گیاهان هم‌خوان است (Khaled et al., 2024). در گوجه‌فرنگی، کاربرد نانولوله‌های کربنی در غلظت بهینه موجب بهبود شاخص‌های اسمزی و افزایش اسمولیت‌ها شد و میزان پرویلین، لیکوپن، و مالیک اسید را افزایش داد (Sigala-Aguilar et al., 2025). در ماش (*Vigna radiata*) نیز نانولوله‌های چندجداره موجب افزایش معنی‌دار پرویلین و بهبود شاخص‌های رشدی شد، هر چند در غلظت‌های بالاتر نشانه‌هایی از تنش اکسیداتیو گزارش شده

نانولوله‌های کربنی می‌توانند به عنوان یک عامل آنتی‌اکسیدانی عمل کنند و میزان MDA را کاهش دهند. این اثر به دلیل توانایی نانولوله‌ها در بهبود جذب عناصر غذایی و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاهان است (Singh et al., 2025). از طرفی نانولوله‌های کربنی می‌توانند فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز را افزایش می‌دهند، که این امر به کاهش میزان MDA منجر می‌شود (Samadi et al., 2020).

**کلروفیل a, b و کلروفیل کل:** کلروفیل a, b و کل تحت تأثیر (یک درصد) غلظت نانولوله‌های کربنی قرار گرفت (جدول ۲). مطابق جدول مقایسه میانگین‌ها، مقدار کلروفیل a, b و کل با افزایش غلظت نانولوله‌ها به صورت پیوسته افزایش یافت. در غلظت ۲ گرم نیز مقدار کلروفیل a, b و کل به ترتیب ۵۶/۹۸٪، ۵۸/۹۲٪ و ۵۸/۴۱٪ نسبت به تیمار شاهد افزایش یافتند (جدول ۳).

افزایش معنی‌دار محتوای کلروفیل‌ها در پاسخ به تیمار نانولوله‌های کربنی در گیاه به‌لیمو نشان می‌دهد که نانولوله‌ها می‌توانند به‌عنوان یک عامل محرک رشد عمل کرده و فرآیندهای فتوسنتزی را تقویت کنند. این روند افزایشی وابسته به غلظت بیانگر آن است که کاربرد نانولوله‌های کربنی موجب بهبود فعالیت فتوسنتزی از طریق ارتقای عملکرد ساختار کلروپلاستی، تثبیت رنگیزه‌ها و جلوگیری از تخریب کلروفیل می‌شود (پوربیرامی هیر و همکاران، ۱۴۰۲). مطالعات مشابه نیز گزارش کرده‌اند که نانولوله‌ها می‌توانند با نفوذ به دیواره سلولی و بهبود انتقال الکترون در زنجیره فتوسنتزی، کارایی فتوشیمیایی را ارتقا دهند (Luo et al., 2022; Sharma et al., 2023) علاوه‌براین، نانولوله‌های کربنی قادرند جذب عناصر ضروری مانند نیتروژن، منیزیم و آهن را که در سنتز کلروفیل نقش کلیدی دارند، افزایش دهند (Hatami et al., 2016). افزایش قابل‌توجه کلروفیل b در مقایسه با کلروفیل a ممکن است ناشی از تنظیم بهتر سنتز رنگیزه‌های کمکی در آنتن نوری باشد که به افزایش کارایی جذب نور و حفاظت از سیستم فتوسنتزی در برابر آسیب اکسیداتیو کمک می‌کند

کربنی مقدار فنل کل افزایش یافته است. این نشان می‌دهد که نانولوله‌های کربنی می‌توانند به عنوان محرک‌های زیستی عمل کنند و با تحریک مسیرهای متابولیک و تعادل اکسید و رادیکال‌های آزاد، تولید ترکیبات فنلی را بیشتر کنند. Sharma و همکاران (۲۰۲۳) بر روی ارزن مرواریدی (Pearl Millet) و Luo و همکاران (۲۰۲۲) بر گیاه ذرت نیز نتایج مشابهی گزارش کردند، نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیاپاز که منجر به تولید ترکیبات فنلی می‌شود تحت نانومواد کربنی افزایش می‌یابد. افزایش فنل کل در اثر کاربرد نانولوله‌های کربنی می‌تواند ناشی از چندین مکانیسم فیزیولوژیک باشد. نانولوله‌ها قادرند از دیواره سلولی عبور کرده و در مسیر انتقال الکترون تغییر ایجاد کنند و با القای میزان کنترل‌شده‌ای از ROS، موجب فعال‌سازی فاکتورهای رونویسی دفاعی و مسیر فنیل پروپانوییدی شوند (Holghoomi et al., 2023). از سوی دیگر، بهبود جذب عناصر غذایی و کارایی فتوسنتز در حضور نانولوله‌ها می‌تواند سبب هدایت بیشتر جریان کربن به سوی مسیر بیوسنتز ترکیبات فنلی گردد (Holghoomi and Colagar, 2025). یافته‌های حاضر با نتایج Hatami و همکاران (۲۰۱۶) بر روی کدو (*Cucurbita pepo*) و Ahmadi, L. و همکاران (۲۰۲۴) بر لفل، و (۲۰۱۵) Ghorbanpour و Hadian و بر گیاه مرزه خوزستانی (*Satureja khuzestanica*) همسو است. آنها نشان دادند که کاربرد نانولوله‌های کربنی موجب افزایش میزان فنول در گیاهان مختلف گردید.

**مالون دی‌آلدئید:** اثر متقابل نوع نانولوله و غلظت، بر محتوای مالون دی‌آلدئید برگ لیمو معنی‌دار نشد اما این شاخص تحت تأثیر معنی‌دار غلظت‌های مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۲). نتایج نشان داد با افزایش غلظت نانولوله کربنی از ۰/۵ به ۲ گرم تفاوت معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد اما بیشترین میزان مالون دی‌آلدئید در تیمار شاهد به ثبت رسید (جدول ۳).

داده‌ها نشان می‌دهد با افزایش غلظت لوله‌های کربنی این شاخص کاهش یافته است. تحقیقات نشان داده‌اند که

(Holghoomi and Colagar, 2025). نتایج این پژوهش با گزارش‌های Li و همکاران (۲۰۲۴) نیز هم‌راستا است که نشان دادند نانولوله‌ها در غلظت‌های بهینه با افزایش انتقال الکترون و کاهش تشکیل ROS، موجب پایداری بیشتر کلروفیل و افزایش ظرفیت فتوسنتزی در گیاهان مختلف می‌شوند. بنابراین چنین به نظر می‌رسد که، تقویت رنگیزه‌های فتوسنتزی در گیاه به‌لیمو تحت اثر نانولوله‌های کربنی را می‌توان یکی از دلایل اصلی افزایش رشد و تولید متابولیت‌ها است.

**آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی:** جدول ۴ نشان داد که آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز)، در سطح احتمال یک درصد و همچنین سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز در سطح احتمال ۵ درصد تحت تأثیر غلظت‌های مختلف نانولوله‌های کربنی قرار گرفتند. مطابق جدول مقایسه میانگین‌ها (جدول ۵)، تفاوت معنی‌داری با افزایش غلظت از صفر به ۱/۵ گرم در فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز مشاهده نشد، اما بیشترین فعالیت این آنزیم در غلظت ۲ گرم به ثبت رسید. نتایج در بررسی سه آنزیم دیگر، روندی مشابه را به ثبت رسانید. مقدار پراکسیداز از ۰/۰۲۶۷ به ۱/۱۵، کاتالاز از ۱/۳۳۳ به ۳/۵۶۷ و آسکوربات پراکسیداز از ۱۳ به ۲۸/۰۸۳ میکرومول بر گرم وزن تر رسید. این تغییرات بیانگر آن است که نانولوله‌های کربنی در غلظت بالاتر موجب تحریک سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی گیاه به‌لیمو شده‌اند و توانایی گیاه در خنثی‌سازی گونه‌های فعال اکسیژن را به‌طور چشمگیری افزایش داده‌اند.

افزایش هم‌زمان در چهار آنزیم اصلی دفاعی، نشانه‌ای از تحریک کنترل‌شده مسیرهای آنتی‌اکسیدانی است که موجب کاهش سطح گونه‌های فعال اکسیژن و جلوگیری از آسیب اکسیداتیو به غشاها و کلروپلاست‌ها می‌شود. نانولوله‌های کربنی می‌توانند با القای میزان محدودی از ROS به‌عنوان پیام‌رسان، بیان ژن‌های مربوط به آنزیم‌های دفاعی را فعال کنند و تعادل میان تولید و حذف رادیکال‌های آزاد را بهبود بخشند (Luo et al., 2022; Ghorbanpour and Hadian, 2015). به‌علاوه، نانولوله‌ها از طریق بهبود جذب عناصر ریزمغذی و

افزایش انتقال الکترون در زنجیره فتوسنتزی، شرایط فیزیولوژیکی بهتری را برای عملکرد سیستم آنتی‌اکسیدانی فراهم می‌سازند. گزارش‌های Sharma و همکاران (۲۰۲۳) و Hatami و همکاران (۲۰۱۶) نیز حاکی از آن است که کاربرد نانولوله‌ها در غلظت‌های پایین تا متوسط، فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز را به‌طور معنی‌داری افزایش داده و منجر به کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و حفظ پایداری غشا می‌شود. همچنین Ghorbanpour و Hadian (۲۰۱۵) بیان کردند که نانومواد کربنی با در غلظت‌های بالا سبب افزای فعالیت‌های آنزیمی پراکسیداز و پلی‌فنول اکسیداز در گیاه مرزه خوزستانی (*Satureja khuzestanica*) شد. بنابراین، نتایج حاضر نشان می‌دهد که تحریک سیستم آنتی‌اکسیدانی توسط نانولوله‌های کربنی نه‌تنها مانع تجمع ROS می‌شود بلکه می‌تواند در افزایش متابولیسم ثانویه و بهبود رشد گیاه نقش کلیدی ایفا کند.

**وزن تر اندام هوایی، وزن خشک ریشه، حجم ریشه و مقدار اسانس:** باتوجه به نتایج جدول آنالیز واریانس (جدول ۴) غلظت نانولوله‌های به کار رفته برای وزن تر اندام هوایی، وزن خشک ریشه و مقدار اسانس اندازه‌گیری‌شده، در سطح احتمال ۱ درصد و حجم ریشه در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار شد. مطابق جدول مقایسه میانگین‌ها (جدول ۶)، صفات مورفولوژیکی و درصد اسانس در گیاه به‌لیمو تحت تأثیر نانولوله‌های کربنی به‌طور معنی‌داری بهبود یافتند. مقدار وزن خشک اندام هوایی معادل ۵۲/۷۲ درصد نسبت به شاهد افزایش یافت. وزن خشک ریشه نیز ۳۶/۷۱٪ افزایش نسبت به شاهد افزایش یافت و کمترین میزان وزن خشک اندام زیرزمینی در شاهد به ثبت رسید و بین تیمارهای ۰/۵ و یک گرم تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. حجم ریشه در تیمار ۲ گرم ۱۹/۰۹٪ نسبت به شاهد افزایش یافت. با افزایش غلظت تا ۱/۵ گرم تفاوت معنی‌داری در حجم ریشه ثبت نشد. کمترین میزان اسانس در تیمار شاهد تا ۰/۵ گرم نانولوله کربنی به ثبت رسید، اما با افزایش غلظت تا ۲ گرم این شاخص به ۱/۰۱۷ درصد رسید (جدول ۶).

جدول ۴- نتایج تجزیه واریانس تأثیر غلظت و نوع نانولوله‌های تک‌جداره و چندجداره بر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و صفات مورفوفیزیکی گیاه به‌لیمو

منابع تغییرات	درجه آزادی	سوپراکسید دیسموتاز	پراکسیداز	آسکوربات پراکسیداز	کاتالاز	وزن خشک اندام هوایی	وزن خشک ریشه	حجم ریشه
انواع نانولوله	۱	۰/۰۲۹ <sup>ns</sup>	۰/۰۵۲ <sup>ns</sup>	۱/۰۰۰ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۷ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۰۵ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۰۱ <sup>ns</sup>	۱/۸ <sup>ns</sup>
غلظت	۵	۰/۶۷۷*	۱/۸۲۷*	۱۵۵/۲۶۱**	۳/۲۸۸**	۰/۱۵۸**	۰/۰۰۳**	۳۷/۸۲۳*
نانولوله × غلظت	۵	۰/۰۴۷ <sup>ns</sup>	۰/۰۵۷ <sup>ns</sup>	۱/۰۱۷ <sup>ns</sup>	۰/۰۱۱ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۰۳ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۰۰۴ <sup>ns</sup>	۲۷/۱۷۹ <sup>ns</sup>
خطا	۲۴	۰/۰۵۹	۰/۶۰۲	۲۱/۲۹۲	۰/۷۵۲	۰/۰۰۰۸	۰/۰۰۰۰۵	۶/۴۱۱
% C.V		۱/۷۰۳	۶/۸۰۷	۴/۳۲۲	۹/۴۷۸	۶/۲۰۴	۱۶/۶۲	۱۰/۱۷۹

ns، \*، \*\* و ns به ترتیب در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و عدم معنی‌داری

جدول ۵- مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف نانولوله بر فعالیت آنزیمی گیاه به‌لیمو

غلظت نانولوله‌ها (گرم)	سوپراکسید دیسموتاز	پراکسیداز	آسکوربات پراکسیداز	کاتالاز
شاهد	۱/۸۳۳ <sup>b</sup>	۰/۲۶۷ <sup>b</sup>	۱۳ <sup>b</sup>	۱/۳۳۳ <sup>b</sup>
۰/۲۵	۱/۸۳۲ <sup>bc</sup>	۰/۱۸۳ <sup>bc</sup>	۱۵/۶۶۷ <sup>b</sup>	۲/۰۱۷ <sup>b</sup>
۰/۵	۲/۰۲ <sup>b</sup>	۰/۱۹۷ <sup>b</sup>	۱۶/۵۸۳ <sup>b</sup>	۲/۰۶۷ <sup>b</sup>
۱	۱/۹۱۲ <sup>b</sup>	۰/۲۹۵ <sup>b</sup>	۱۵ <sup>b</sup>	۱/۹۵ <sup>b</sup>
۱/۵	۲/۰۸ <sup>a</sup>	۰/۳ <sup>ab</sup>	۲۰/۳۳۳ <sup>ab</sup>	۲/۲۸ <sup>ab</sup>
۲	۲/۰۶۷ <sup>a</sup>	۱/۱۵ <sup>a</sup>	۲۷/۰۸۳ <sup>a</sup>	۳/۵۶۷ <sup>a</sup>

میانگین‌های دارای حروف مشابه براساس آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

جدول ۶- مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف نانولوله بر صفات مورفوفیزیکی و اسانس گیاه به‌لیمو

غلظت نانولوله‌ها (گرم)	وزن خشک اندام هوایی (گرم)	وزن خشک اندام زیرزمینی (گرم)	حجم ریشه (درصد)	اسانس (درصد)
شاهد	۰/۸۲۷ <sup>e</sup>	۰/۱۴۳ <sup>d</sup>	۶/۱۳ <sup>b</sup>	۰/۷۸۳ <sup>d</sup>
۰/۲۵	۰/۸۹۸ <sup>d</sup>	۰/۱۵ <sup>cd</sup>	۶/۴۵ <sup>ab</sup>	۰/۸ <sup>cd</sup>
۰/۵	۰/۹ <sup>d</sup>	۰/۱۵۷ <sup>c</sup>	۶/۳ <sup>ab</sup>	۰/۸۵ <sup>bcd</sup>
۱	۱/۰۴۸ <sup>c</sup>	۰/۶ <sup>c</sup>	۵/۶۶۷ <sup>bc</sup>	۰/۸۸۳ <sup>bc</sup>
۱/۵	۱/۱ <sup>b</sup>	۰/۱۸۲ <sup>b</sup>	۶/۶۶۷ <sup>ab</sup>	۰/۹ <sup>b</sup>
۲	۱/۲۶۳ <sup>a</sup>	۰/۱۹۵ <sup>a</sup>	۷/۳ <sup>a</sup>	۱/۰۱۷ <sup>a</sup>

میانگین‌های دارای حروف مشابه براساس آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

این الگوی افزایشی در صفات رشدی و اسانس بیانگر نقش مثبت CNTها در بهبود فعالیت فیزیولوژیکی، توسعه سیستم ریشه‌ای و تحریک مسیرهای سنتز متابولیت‌های ثانویه است. به‌طورکلی، نانولوله‌های کربنی در غلظت‌های مناسب موجب

ریزمغذی و تحریک مسیرهای فتوکربوهیدراتی، انرژی و پیش‌سازهای لازم برای سنتز اسانس را فراهم می‌کنند. یافته‌های این پژوهش با مطالعات Sharma و همکاران (۲۰۲۳) نیز همسو است که در گیاه ارزن، افزایش رشد و تجمع ترکیبات ثانویه را در اثر کاربرد CNTها گزارش کردند.

### نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که غلظت‌های مختلف نانولوله‌های کربنی تأثیر چشمگیری بر پاسخ‌های فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و مورفولوژیک گیاه به لیمو داشتند. با افزایش غلظت نانولوله‌ها، تغییرات معنی‌داری در میزان پرولین، کلروفیل، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و شاخص‌های رشدی مشاهده شد. در غلظت‌های پایین‌تر (۰/۲۵ و ۰/۵ گرم)، اغلب صفات بهبود ملامتی را نشان دادند، اما در سطوح بالاتر، به‌ویژه در غلظت ۲ گرم، اثرات بسیار برجسته‌ای بر افزایش پارامترهای فیزیولوژیک و رشدی مشاهده شد. غلظت ۱/۵ و ۲ گرم نانولوله‌ها موجب افزایش معنی‌دار فنل کل، کلروفیل‌های a, b و کل، و اسانس گردید. از سوی دیگر، کاهش مالون دی‌آلدئید در سطوح بالای تیمار، نشان‌دهنده افزایش میزان فعالیت آنزیمی در حضور نانولوله‌ها است. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که کاربرد نانولوله‌های کربنی چندجداره در غلظت‌های مناسب نه تنها موجب افزایش رشد فیزیکی گیاه به لیمو می‌شود، بلکه با بهبود وضعیت متابولیکی و تحریک مسیرهای بیوشیمیایی، کیفیت اسانس و ترکیبات دارویی را نیز ارتقا می‌دهد. چنین یافته‌هایی چشم‌انداز مثبتی برای بهره‌گیری از فناوری نانو در تولید و بهبود گیاهان دارویی فراهم می‌آورد.

افزایش رشد زیست‌توده، کارایی فتوسنتزی و تجمع ترکیبات معطر شده و می‌تواند به‌عنوان یک عامل تقویت‌کننده رشد و کیفیت در تولید گیاهان دارویی مورد استفاده قرار گیرند (Hao *et al.*, 2023).

افزایش معنی‌دار وزن تر اندام هوایی، وزن خشک ریشه، حجم ریشه و میزان اسانس در تیمار نانولوله‌های کربنی نسبت به شاهد نشان‌دهنده اثرات مثبت CNTها بر رشد و متابولیسم گیاه به لیمو است. در این پژوهش، تیمار ۲ گرم باعث افزایش ۴۵/۶ درصدی در وزن تر، ۵۱ درصدی در وزن خشک ریشه، ۴۳/۲ درصدی در حجم ریشه و بیش از ۵۳ درصد در میزان اسانس نسبت به شاهد شد. این الگوی افزایشی حاکی از آن است که نانولوله‌های کربنی با بهبود کارایی فیزیولوژیک، افزایش فتوسنتز و نموسیستم ریشه‌ای، رشد رویشی و زایشی را تقویت کرده‌اند. نانولوله‌ها می‌توانند با نفوذ در بافت‌های ریشه، نفوذپذیری غشا و انتقال آب و مواد غذایی را افزایش دهند و از این طریق توسعه ریشه و جذب عناصر را تسهیل کنند (Luo *et al.*, 2022). افزایش سطح فتوسنتز نیز موجب تخصیص بهتر ترکیبات فتوسنتزی به اندام‌های هوایی و افزایش زی‌توده شده است (Khodakovskaya *et al.*, 2009).

افزایش چشمگیر اسانس در پاسخ به نانولوله‌ها احتمالاً ناشی از تحریک مسیرهای سنتز متابولیت‌های ثانویه مانند مسیر مولونات (Mevalonate) و مسیر (-C-2-Plastid-localized MEP (methyl-d-erythritol 4-phosphate است که در تولید ترپنوئیدها نقش دارند. بر اساس مطالعات Prakash و همکاران (۲۰۲۵) و Holghoomi و Colagar (۲۰۲۵) نانومواد کربنی می‌توانند از طریق تعدیل تنش اکسیداتیو و فعال‌سازی آنزیم‌های کلیدی، تولید ترکیبات معطر و اسانس‌ها را در گیاهان دارویی افزایش دهند. همچنین Lahiani و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که CNTها با افزایش جذب عناصر

### منابع

پوربیرامی هیر، یونس، خسروی مجدر، مهدی، ترابی گیگلو، موسی، چمنی، اسماعیل، ملکی لجایر حسن، و احدزاده، مهسا (۱۴۰۲). تأثیر کاربرد نانولوله‌های کربنی بر باززایی گیاه رزماری در شرایط درون شیشه‌ای. *مجله علوم و فنون باغبانی ایران*، ۲۴ (۱)، ۹۵ -

20.1001.1.16807154.1402.24.1.8.3 .۱۱۰

- محمدپور، فهمیه، زرافشار، مهرداد، قاسمی، و آقباش، فرهاد (۱۳۹۸). تأثیر تیمار نانولوله‌های کربنی بر جوانه‌زنی بنه (*Pistacia atlantica*) و خینجوک (*Pistacia khinjuk*) و مقایسه آن با تیمارهای رایج. *تحقیقات و جنگل و صنوبر ایران*، ۲۷، ۴۶۴-۴۷۴. 10.22092/IJFPR.2020.128824.1887
- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121-126. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05016-3)
- Ahmadi, S. Z., Zahedi, B., Ghorbanpour, M., & Mumivand, H. (2024). Comparative morpho-physiological and biochemical responses of *Capsicum annuum* L. plants to multi-walled carbon nanotubes, fullerene C60 and graphene nanoplatelets exposure under water deficit stress. *BMC Plant Biology*, 24(1), 116. <https://doi.org/10.1186/s12870-024-04798-y>
- Ali, M. H., Sobze, J. M., Pham, T. H., Nadeem, M., Liu, C., Galagedara, L., & Thomas, R. (2020). Carbon nanotubes improved the germination and vigor of plant species from peatland ecosystem via remodeling the membrane lipidome. *Nanomaterials*, 10(9), 1852. <https://doi.org/10.3390/nano10091852>
- Alipieva, K., Korkina, L., Orhan, I. E., & Georgiev, M. I. (2014). Verbascoside-A review of its occurrence, (bio) synthesis and pharmacological significance. *Biotechnology Advances*, 32(6), 1065-1076. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.07.001>
- Angiolillo, A., Leccese, D., Palazzo, M., Vizzari, F., Casamassima, D., Corino, C., & Di Costanzo, A. (2021). Effects of *Lippia citriodora* leaf extract on lipid and oxidative blood profile of volunteers with hypercholesterolemia: A preliminary study. *Antioxidants*, 10(4), 521. <https://doi.org/10.3390/antiox10040521>
- Arnon, D. I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. *Plant Physiology*, 24(1), 1-15. 10.1104/pp.24.1.1
- Bahramsoltani, R., Rostamiasrabadi, P., Shahpiri, Z., Marques, A. M., Rahimi, R., & Farzaei, M. H. (2018). *Aloysia citrodora* Palau (*Lemon verbena*): A review of phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 222, 34-51. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.04>
- Beauchamp, C., & Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44(1), 276-287. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8)
- Begum, P., Ikhtari, R., & Fugetsu, B. (2014). RETRACTED: Potential impact of multi-walled carbon nanotubes exposure to the seedling stage of selected plant species. *Nanomaterials*, 4(2), 203-221. <https://doi.org/10.3390/nano4020203>
- Canas, J. E., Long, M., Nations, S., Vadan, R., Dai, L., Luo, M., & Olszyk, D. (2008). Effects of functionalized and nonfunctionalized single-walled carbon nanotubes on root elongation of select crop species. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(9), 1922-1931.
- Chance, B., & Maehly, A. C. (1955). Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology*, 2, 764-775. <https://doi.org/10.1002/9780470110171.ch14>
- Fitsiou, E., Mitropoulou, G., Spyridopoulou, K., Vamvakias, M., Bardouki, H., Galanis, A., & Pappa, A. (2018). Chemical composition and evaluation of the biological properties of the essential oil of the dietary phytochemical *Lippia citriodora*. *Molecules*, 23(1), 123. <https://doi.org/10.3390/molecules23010123>
- Ghorbanpour, M., & Hadian, J. (2015). Multi-walled carbon nanotubes stimulate callus induction, secondary metabolites biosynthesis and antioxidant capacity in medicinal plant *Satureja khuzestanica* grown in vitro. *Carbon*, 94, 749-759. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2015.07.056>
- Hao, Y., Yu, Y., Sun, G., Gong, X., Jiang, Y., Lv, G., & Qian, C. (2023). Effects of multi-walled carbon nanotubes and nano-silica on root development, leaf photosynthesis, active oxygen and nitrogen metabolism in maize. *Plants*, 12(8), 1604. <https://doi.org/10.3390/plants12081604>
- Hatami, M. (2017). Toxicity assessment of multi-walled carbon nanotubes on *Cucurbita pepo* L. under well-watered and water-stressed conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 142, 274-283. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.04.018>
- Hatami, M., Kariman, K., & Ghorbanpour, M. (2016). Engineered nanomaterial-mediated changes in the metabolism of terrestrial plants. *Science of the Total Environment*, 571, 275-291. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.07.065>
- Heath, R. L., & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125(1), 189-198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90132-8](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90132-8)
- Holghoomi, R., & Colagar, A. H. (2025). Nanoparticle-assisted synthesis of anti-aging secondary metabolites in medicinal plants. *Plant Nano Biology*, 100184. <https://doi.org/10.1016/j.pnanb.2025.100184>
- Holghoomi, R., Hosseini Sarghein, S., Khara, J., Hosseini, B., Rahdar, A., & Kyzas, G. Z. (2023). Foliar application of Phenylalanine functionalized multi-walled carbon nanotube improved the content of volatile compounds of basil grown in greenhouse. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(31), 77385-77407. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-29463-4>

- Ioannou, A., Gohari, G., Papaphilippou, P., Panahirad, S., Akbari, A., Dadpour, M. R., Krasia-Christoforou, T., & Fotopoulos, V. (2020). Advanced nanomaterials in agriculture under a changing climate: The way to the future? *Environmental and Experimental Botany*, 176, 104048. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104048>
- Khaled, Y., Hegab, M. M., Okla, M. K., AlGarawi, A. M., Tawfik, W. Z., Abd Elgayed, G., & Sayed, M. (2024). Potential role of multiwalled carbon nanotube priming in boosting nitrogen metabolism and nutritional value during the sprouting process. *Journal of Nanoparticle Research*, 26(10), 242. <https://doi.org/10.1007/s11051-024-05836-9>
- Khodakovskaya, M., Dervishi, E., Mahmood, M., 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(10), 3221-3227. <https://doi.org/10.1021/nn900636h>
- Ku, Y. S., Ng, M. S., Cheng, S. S., Lo, A. W. Y., Xiao, Z., Shin, T. S., Chung, G., & Lam, H. M. (2020). Understanding the composition, biosynthesis, accumulation and transport of flavonoids in crops for the promotion of crops as healthy sources of flavonoids for human consumption. *Nutrients*, 12, 1717. <https://doi.org/10.3390/nu12061717>
- Lahiani, M. H., Nima, Z. A., Villagarcia, H., Biris, A. S., & Khodakovskaya, M. V. (2017). Assessment of effects of the long-term exposure of agricultural crops to carbon nanotubes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(26), 6654-6662. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01581>
- Li, P., Xia, Y., Song, K., & Liu, D. (2024). The impact of nanomaterials on photosynthesis and antioxidant mechanisms in gramineae plants: Research progress and future prospects. *Plants*, 13(7), 984. <https://doi.org/10.3390/plants13070984>
- Liu, Q., Chen, B., Wang, Q., Shi, X., Xiao, Z., Lin, J., & Fang, X. (2010). Carbon nanotubes as molecular transporters for walled plant cells. *Nano Letters*, 9(3), 1007-1010. <https://doi.org/10.1021/nl903110y>
- Luo, Y., Zeng, W., Lei, G., Hou, Y., Ao, C., Chen, H., & Srivastava, A. K. (2022). The effects of multiwalled carbon nanotubes and *Bacillus subtilis* treatments on the salt tolerance of maize seedlings. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1093529. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1093529>
- Marcetic, M., Bufan, B., Drobac, M., Antic Stankovic, J., Arsenovic Ranin, N., Milenkovic, M. T., & Bozic, D. D. (2025). Multifaceted biological properties of verbascoside/acteoside: Antimicrobial, cytotoxic, anti-inflammatory, and immunomodulatory effects. *Antibiotics*, 14(7), 697. <https://doi.org/10.3390/antibiotics14070697>
- Munchinger, I. K., Hajek, P., Akdogan, B., Caicoya, A. T., & Kunert, N. (2023). Leaf thermal tolerance and sensitivity of temperate tree species are correlated with leaf physiological and functional drought resistance traits. *Journal of Forestry Research*, 34, 63-76. <https://doi.org/10.1007/s11676-022-01561-6>
- Nakano, Y., & Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22(5), 867-880. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232>
- Nobilae, V., Cestone, E., Ghirlanda, S., Poggi, A., Navarro, P., Garcia, A., & Caturla, N. (2024). Skin and scalp health of a specific botanical extract blend: Results from a double-blind placebo-controlled study in urban outdoor workers. *Cosmetics*, 11(4), 139. <https://doi.org/10.3390/cosmetics11040139>
- Ombito, J. O., Salano, E. N., Yegon, P. K., Ngetich, W. K., & Mwangi, E. M. (2014). A review on the chemistry of some species of genus *Lippia* (Verbenaceae family). *Journal of Scientific and Innovative Research*, 3(4), 460-466.
- Pascual, M. E., Slowing, K., Carretero, E., Mata, D. S., & Villar, A. (2001). *Lippia*: Traditional uses, chemistry and pharmacology: A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 76(3), 201-214. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00299-5](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00299-5)
- Prakash, O., Kumari, B., Singh, M. P., Pal, P., Singh, A. K., & Singh, S. P. (2025). Role of carbon-based nanomaterials in crop plants salinity stress management. In: *Emerging Carbon Nanomaterials for Sustainable Agricultural Practices: Synthesis, Plant Growth, Performance, Production and Protection*. Pp. 209-231. Singapore: Springer Nature Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-99-0819-5\\_10](https://doi.org/10.1007/978-981-99-0819-5_10)
- Quirantes-Pine, R., Herranz-Lopez, M., Funes, L., Borrás-Linares, I., Micol, V., Segura-Carretero, A., & Fernandez-Gutierrez, A. (2013). Phenylpropanoids and their metabolites are the major compounds responsible for blood-cell protection against oxidative stress after administration of *Lippia citriodora* in rats. *Phytomedicine*, 20(12), 1112-1118. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.06.002>
- Renzetti, M., Funck, D., & Trovato, M. (2024). Proline and ROS: A unified mechanism in plant development and stress response? *Plants*, 14(1), 2. <https://doi.org/10.3390/plants14010002>
- Samadi, S., Saharkhiz, M. J., Azizi, M., Samiei, L., & Ghorbanpour, M. (2020). Multi-walled carbon nanotubes stimulate growth, redox reactions and biosynthesis of antioxidant metabolites in *Thymus daenensis* celak. in vitro. *Chemosphere*, 249, 126069. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126069>
- Sharma, A., Kothari, S. L., & Kachhwaha, S. (2023). Impacts of multi-walled carbon-nanotubes on the growth of pearl millet. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 11(4), 170-177. <https://doi.org/10.7324/JABB.2023.11403>
- Shekhawat, G. S., Mahawar, L., Rajput, P., Rajput, V. D., Minkina, T., & Singh, R. K. (2021). Role of engineered carbon nanoparticles (CNPs) in promoting growth and metabolism of *Vigna radiata* (L.) Wilczek: Insights into the biochemical and physiological responses. *Plants*, 10 (7), 1317. <https://doi.org/10.3390/plants10071317>

- Sigala-Aguilar, N. A., Flores-Renteria, D., Vera-Reyes, I., Moya-Cadena, S., Fernandez-Luqueno, F., & Lopez, M. G. (2025). Multi-walled carbon nanotubes: Effect on the growth-development of tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.), biocompounds content in tomato fruits and quality indicators of cultivated soil. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 1-21. <https://doi.org/10.1007/s42729-025-01234-5>
- Singh, M. P., Gazali, A., Prakash, O., Pal, P., Singh, A. K., Prakash, A., & Sonkar, S. (2025). Harnessing carbon nanotubes for enhanced plant growth and sustainable agriculture: Opportunities and challenges. *Plant Nano Biology*, 100178. <https://doi.org/10.1016/j.pnanb.2025.100178>
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Vithanage, M., Seneviratne, M., Ahmad, M., Sarkar, B., & Ok, Y. S. (2017). Contrasting effects of engineered carbon nanotubes on plants: A review. *Environmental Geochemistry and Health*, 39(6), 1421-1439. <https://doi.org/10.1007/s10653-017-9936-3>
- Yeshi, K., Crayn, D., Ritmejerite, E., & Wangchuk, P. (2022). Plant secondary metabolites produced in response to abiotic product development. *Molecules*, 27, 313. <https://doi.org/10.3390/molecules27010313>
- Zaytseva, O., & Neumann, G. (2016). Carbon nanomaterials: Production, impact on plant development, agricultural and environmental applications. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 3(1), 17. <https://doi.org/10.1186/s40538-016-0076-2>

## Changes morpho-physiological responses of lemon verbena to different concentrations of single-walled and multi-walled carbon nanotubes

Atiyeh Oraee<sup>1\*</sup>, Toktam Oraee<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Plant Sciences, Medicinal Plants, Eqbal Lahoorei Higher Education Institute of Mashhad, Mashhad, Iran

<sup>2</sup> Department of Horticulture and Green Spaces, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

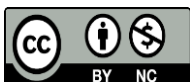
### Abstract

Lemon verbena (*Lippia citriodora*) is a valuable medicinal plant widely utilized in the food, pharmaceutical, and cosmetic industries due to its rich content of secondary metabolites, including phenolics, flavonoids, and aromatic essential oils. In recent years, the application of carbon nanotubes (CNTs) has emerged as a novel approach to enhancing plant growth and improving the production of bioactive compounds. This study evaluated the effects of different concentrations of single-walled and multi-walled carbon nanotubes (0, 0.25, 0.5, 1, and 2 g) on the physiological and morphological responses of lemon verbena under greenhouse conditions. The experiment was conducted using a completely randomized design with three replications, and CNT treatments were applied as foliar sprays. The results showed that the traits were influenced by the simple effects of carbon nanotube concentrations. Treating with 2 g of carbon nanotubes significantly increased proline (by 70%), phenols (by 19%), and total chlorophyll (by 58%) compared to the control. As the concentration of carbon nanotubes increased, along with a decrease in malondialdehyde levels, a rising trend was observed in enzyme activities, with the highest activities recorded in the 2 g treatment: superoxide dismutase (2.067  $\mu\text{mol g}^{-1}$  FW), peroxidase (1.15  $\mu\text{mol g}^{-1}$  FW), ascorbate peroxidase (27.08  $\mu\text{mol g}^{-1}$  FW), and catalase (3.57  $\mu\text{mol g}^{-1}$  FW). Additionally, growth indices such as dry weight of both aerial and underground parts were positively affected by higher concentrations of nanotubes. The highest essential oil percentage was observed in the 2 g treatment (1.017%). Overall, the use of single-walled carbon nanotubes at a concentration of 2 g, due to its economic efficiency, can be considered an effective tool for improving growth and essential oil content in lemon verbena plants.

**Keywords:** Allicitor, Carbon nanotubes, Medicinal Plant, Secondary metabolites

Received: Oct. 10, 2025; Revised: Dec. 09, 2025; Accepted: Dec. 16, 2025; Published Online: June. 02, 2026

\*Corresponding Author: a.oraee@eqbal.ac.ir



Copyright © 2025 Iranian Society of Plant Physiology, Published by Isfahan University of Technology press. This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Noncommercial 4.0 International license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.