مقاله پژوهشی

# اثر تیمار با نانولوله‌ی کربنی چند لایه به‌عنوان الیسیتور در افزایش فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی و محتوای فنولی گیاه ریحان (*Ocimum basilicum* L.)

رقیه حلقومی [۱]، سیاوش حسینی سرقین [۱*]، جلیل خارا [۱] و بهمن حسینی [۲]

[۱] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، [۲] گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۷/۲۷، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۹/۱۱/۰۷)

**چکیده**

**پژوهش حاضر با هدف بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف نانولوله‌ی کربنی چند دیواره (صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) و کربن فعال بر محتوای فنول و فلاوونوئید کل، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، محتوای پراکسید هیدروژن، آنتوسیانین، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز، پلی‌فنول اکسیداز، فنیل‌آلانین آمونیالیاز و تیروزین آمونیالیاز به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. تیمار کربن فعال به‌منظور بررسی آثار نانولوله‌های کربنی و مقایسه‌ی آن با حالت معمول کربن در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. نتایج آنالیز داده‌ها نشان داد با افزایش غلظت نانولوله‌ی کربنی، محتوای پراکسید هیدروژن، فنول، آنتوسیانین و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نسبت به حالت شاهد و تیمار کربن فعال افزایش یافت. بیشترین محتوای فلاونوئید در غلظت ۵۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانولوله‌ی کربنی (به‌ترتیب ۰/۰۰۱۰۸۸ و ۰/۰۰۱۰۴۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) مشاهده شد. فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز نیز با افزایش غلظت نانولوله‌ی کربنی افزایش اندکی نشان داد و از میان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نیز، فعالیت کاتالاز و پراکسیداز با افزایش غلظت نانولوله‌ی کربنی افزایش یافت. در بررسی‌های انجام‌شده، تیمار کربن فعال رفتاری مشابه حالت شاهد از خود نشان داد. به‌طورکلی نتایج این پژوهش حاکی از آن است که استفاده از نانولوله‌ی کربنی به‌عنوان محرک، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه ریحان را بالا برده و از طرفی منجر به افزایش محتوای ترکیبات فنولی شده است.**

**واژگان کلیدی: آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز، کربن فعال، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه، محتوای ترکیبات فنولی، نانولوله‌ی کربنی چند دیواره**

**مقدمه**

ریحان با نام علمی (*Ocimum basilicum* L.)، از گیاهان دارویی مهم و ارزشمند خانواده نعناعیان است، که دارای خواص ضدباکتریایی، ضدقارچی، ضدویروسی، ضدالتهاب و آنتی‌اکسیدانی است. ریحان دارای ترکیبات فنیل پروپانوییدی است که مهم‌ترین آنها کاویکول، متیل کاویکول و اوژنول است (Javanmardi *et al*., 2002).

در بسیاری از گیاهان، استفاده از محرک‌های زیستی و غیر زیستی تأثیر به‌سزایی در افزایش عملکرد و کیفیت آن‌ها داشته است. نانوذرات از جمله موادی هستند که تأثیر مثبت و منفی آن‌ها بر عملکرد گیاهان و جنبه‌های مختلف رشدشان گزارش شده است که نوع این تأثیر بستگی به عوامل مختلفی چون غلظت، اندازه، خواص فیزیکی و شیمیایی و ترکیب نانوذرات دارد (Hatami and Ghorbanpour, 2014). یکی از انواع

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: siavash.hosseini19@gmail.com

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-26 ]

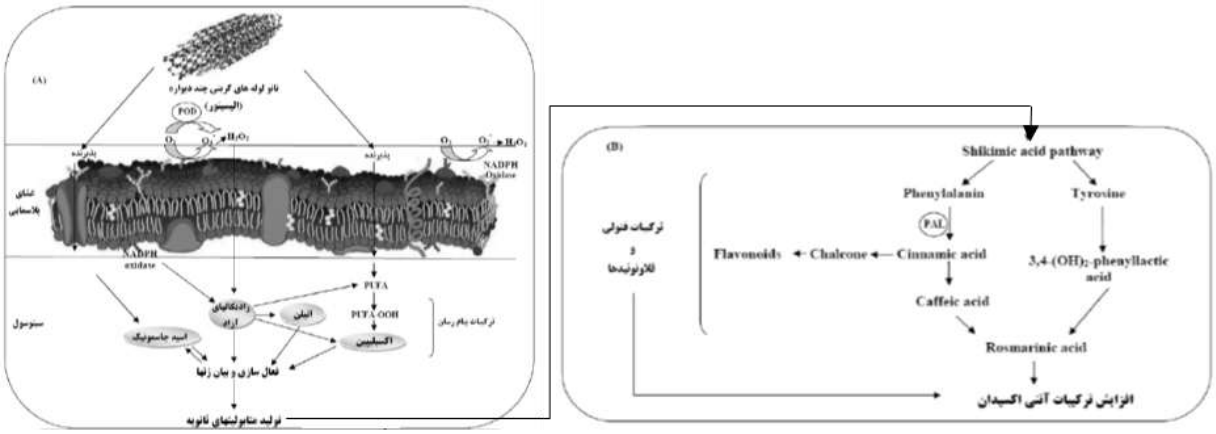
[ DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.16.8 ]

نانوذرات شناخته شده و مؤثر در سیستم‌های گیاهی، نانولوله‌های کربنی است. این نانولوله‌ها به‌دلیل ویژگی‌های خاصشان، قادرند از دیواره سلولی و غشای سلول‌های گیاهی عبور کنند و ماده‌ی موردنظر را به‌راحتی به سلول تحویل دهند. این دسته از محرک‌ها از لحاظ شکل واجد ساختارهای استوانه‌ای با قطر چند نانومتری هستند که به شکل صفحات گرافینی پیچانده شده‌اند و از نظر طول، قطر، کایرالیته (تقارن صفحات گرافین) و شمار لایه‌ها متفاوت بوده و شامل دو گروه نانولوله‌های تک لایه Single Walled Carbon Nanotubes (SWCNTs) و چند لایه Multi Walled Carbon Nanotubes (MWCNTs) هستند (Zhang *et al*., 2013).

مطالعات مختلفی انجام شده است که اثرات مثبت و منفی نانولوله‌های کربنی را در سیستم‌های زیستی و گیاهی نشان می‌دهد. گیاهان و سلول‌های گیاهی گرایش زیادی به تجمع نانولوله‌های کربنی دارند و این موضوع گیاهان را به‌عنوان مهم‌ترین حلقه‌ای که باعث ورود نانولوله‌های کربنی به چرخه‌های زیستی می‌شود، قرار می‌دهد. برخی از مطالعات نشان داده‌اند نانولوله‌های کربنی آثار سمیتی بر گیاهان دارند. اما آستانه‌ای که علائم سمیت در آن ایجاد می‌شود به‌طور گسترده‌ای بین گونه‌های گیاهی مختلف متفاوت است و تأثیر ذرات نانو در گونه‌های مختلف گیاهی بسته به مرحله‌ی رشد گیاه، روش و مدت زمان قرارگرفتن در معرض ذرات نانو، اندازه، غلظت، ترکیب شیمیایی، ساختار سطح، حلالیت، شکل و میزان تجمع ذرات، متفاوت است (Nel *et al*., 2006). طبق مطالعات صورت گرفته روی سلول‌های جانوری نیز نانولوله‌ها در غلظت‌های پایین موجب افزایش رشد سلولی و در غلظت‌های بالاتر موجب واکنش‌های التهابی و پاسخ‌های ایمنی سلولی، مشابه وضعیتی که در برابر تهاجم یک عفونت وریدی از خود نشان می‌دهد، می‌شوند. در واقع اثر نانولوله‌ها در ایجاد مرگ سلولی ناشی از تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد و عوارض ناشی از آن، تخلیه‌ی مواد آنتی‌اکسیدان و تنظیم افزایشی برخی از ژن‌ها و تنظیم کاهشی برخی ژن‌های دیگر است (Salata, 2004). بنابراین ضروری است تحقیقات دقیق‌تری در مورد آثار این ذرات بر گیاهان به‌عنوان حلقه‌ی زنجیره‌ی غذایی و سلامت انسان انجام شود. به‌عنوان مثال، نتایج تحقیقات Lin و همکاران (۲۰۰۹) نشان داد که اعمال اثر MWCNTs در سوسپانسیون سلولی کشت سلول‌های آرابیدوپسیس (*Arabidopsis taliana*) باعث کاهش درصد زنده‌مانی، وزن خشک، محتوای کلروفیل و فعالیت سوپراکسید دیسموتاز گردید (Lin *et al*., 2009). همچنین Tiwari و همکاران (۲۰۱٤) نشان دادند که گیاهچه‌های ذرت (*Zea mays* L.) در محیط‌کشت آگار که با سطوح مختلفی از MWCNTs تیمار شده‌اند، رشد و جذب آب را افزایش داده‌اند. Mondal و همکاران (۲۰۱۱) اثبات کردند که سرعت جوانه‌زنی و رشد گیاه (*Brassica juncea* L.) در حضور MWCNTs افزایش می‌یابد. علاوه بر این‌ها اثرات سودمند MWCNTs بر روی جوانه‌زنی و رشد گونه‌های مختلف گیاهی مانند *Lactuca sativa*، *Raphanus sativus*، *Daucus carota*، *Allium cepa*، *Brassica napus*، *Lolium perenne*، *Cucumis sativus* و *Solanum lycopersicum* (Canas *et al*., 2008) (Villagarcia *et al*., 2012) اثبات شده است. مطالعه‌ای که در گیاه گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum*) انجام شد نشان داد نانولوله‌های کربنی با نفوذ در پوشش بذرهای این گیاه باعث افزایش رشد و سرعت جوانه‌زنی از طریق افزایش در جذب آب می‌شوند (Khodakovskaya *et al*., 2009). به‌طور کلی الیسیتورها، (مولکول‌های خارجی که می‌توانند به پروتئین‌های گیرنده اختصاصی بر روی غشای سلول‌های گیاهی متصل شده و باعث پاسخ‌های دفاعی گیاه شوند) باعث ایجاد پاسخ فوق حساسیتی در گیاه می‌شوند که با توجه به گونه‌ی گیاهی، مرحله‌ی نموی‌اش، شرایط متابولیک و نوع الیسیتور این پاسخ با شدت‌های مختلف بروز می‌کند (شکل ۱). اتصال الیسیتور به گیرنده‌ی غشای پلاسمایی، جریان خروجی یون‌های کلر و پتاسیم را القا می‌کند که باعث ایجاد تغییرات سریع در الگوی فسفریلاسیون پروتئین، فعال‌شدن پروتئین کیناز و G–پروتئین می‌شود. با اسیدی‌شدن سیتوپلاسم، آنزیم NADPH اکسیداز به‌عنوان مسئول تولید رادیکال‌های آزاد

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-26 ]

[ DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.16.8 ]




**شکل ۱- مکانیسم اثر الیسیتورها و پاسخ فوق حساسیتی گیاهان و تولید متابولیت‌های ثانویه (چگینی و همکاران، ۱۳۹۵)**

اکسیژن، فعال می‌شود. جاسمونات و سالیسیلیک اسید به‌عنوان پیامبرهای ثانویه تولید می‌شوند و باعث فعال‌شدن آنزیم‌های دفاعی مانند فنیل‌آلانین آمونیالیاز (PAL) و چالکون سنتاز می‌شوند که تولید مولکول‌های دفاعی مانند فیتوآلکسین‌ها و در نهایت متابولیت‌های ثانویه را القا می‌کند (Ghorbanpour and Hadian, 2015) نانومواد‌ی مانند نانولوله‌های کربنی می‌توانند به‌عنوان ترکیبات سیگنال برای واکنش‌های متابولیکی و فیزیولوژیکی عمل کنند. چگینی و همکاران (۱۳۹۵) نشان دادند استفاده از غلظت کم (۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) نانولوله‌های کربنی چند دیواره عاملدار به‌همراه تنش متوسط خشکی (۵۰ درصد ظرفیت زراعی) شاخص‌های فیزیولوژیکی و فعالیت آنتی‌اکسیدان عصاره مریم‌گلی را بهبود بخشید. در تحقیق دیگری در گیاه تنباکو، مشاهده شد تیمار گیاه با نانولوله کربنی در غلظت‌های بین ۵ تا ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر باعث افزایش ۵۵ تا ٦٤ درصدی سرعت رشد سلولی می‌شود (Khodakovskaya *et al.*, 2012). با توجه به اینکه ریحان دارای متابولیت‌های ثانویه ارزشمندی است و با توجه به ضرورت و نیاز توجه و تمرکز بیشتر بر گیاهان دارویی و استفاده بهینه از مواد مؤثره‌ی آنها و با در نظرداشتن اثرات مثبتی که از نانو تیوب کربنی بر شاخص‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی برخی گیاهان گزارش شده است، پژوهش حاضر به‌منظور بررسی اثر نانولوله کربنی چند دیواره بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و تغییر محتوای فنولی گیاه ریحان انجام شد.

## مواد و روش‌ها

**کشت و آماده‌سازی ریحان**: بذور ریحان (*Ocimum basilicum* L.) رقم کشکنی لولو (Keshkeni levello)، از مرکز تحقیقات کشاورزی دانشگاه ارومیه تهیه گردید. بذرهای ریحان در سینی‌های نشا حاوی پیت‌ماس و پرلیت به نسبت برابر کشت داده شد. سپس گلدان‌های پلاستیکی با ارتفاع ۲۰ سانتی‌متر و قطر دهانه ۱۵ سانتی‌متر انتخاب شدند. کف گلدان‌ها با شن درشت تا ارتفاع دو سانتی‌متر پر شد و گیاهچه‌های یکنواخت پس از یک هفته رشد در سینی‌های نشا به گلدان‌های پرشده با نسبت برابری از ماسه و پیت‌ماس انتقال داده شد. گلدان‌ها در شرایط یکسان دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه در طول روز، ۱۸ تا ۲۰ درجه سانتی‌گراد در طی شب و طول روشنایی ١٦ ساعت و ۸ ساعت تاریکی در طی شبانه‌روز با شدت نور ٦٠ $\mu m.m^2.s^{-1}$ (اندازه‌گیری شده با دستگاه لوکس‌متر دیجیتالی Light Meter UT383) و رطوبت نسبی ٪۳۱ (اندازه‌گیری شده با دستگاه رطوبت‌سنج CEM DT-323) در اتاقک رشد دانشکده علوم نگهداری شده و تا مرحله گلدهی آبیاری گلدان‌ها یک روز در میان انجام شد.

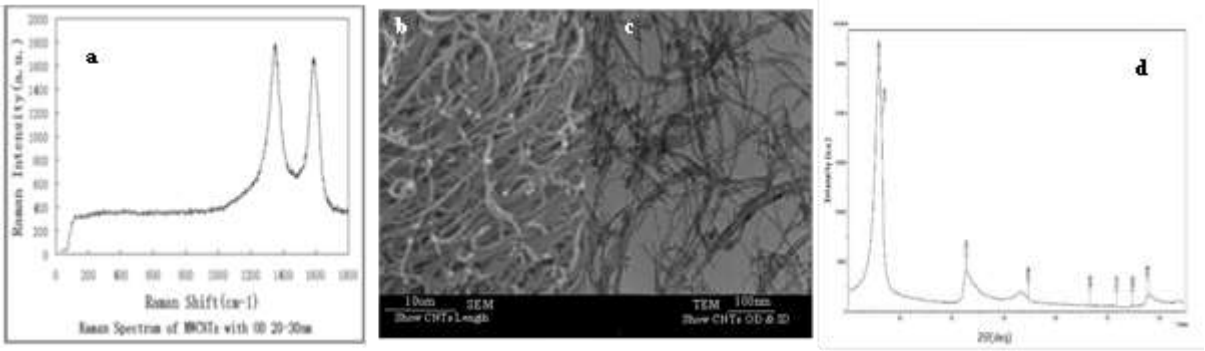
**تیمار با نانولوله کربنی**: نانولوله کربنی چند جداره با قطر خارجی ۳۰-۲۰ نانومتر و قطر داخلی ۱۰-۵ نانومتر و طول ۳۰-۱۰ میکرومتر از شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان (مشهد – ایران) تهیه شد. جدول ۱ و شکل ۲ ویژگی‌های نانوذره را نشان می‌دهد. غلظت‌های بهینه برای اعمال بر گیاه ریحان با

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-26 ]
[ DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.16.8 ]

**جدول ۱- خصوصیات نانولوله‌ی کربنی چند دیواره**

| Type of particle | Multi Walled Carbon Nanotube |
|---|---|
| Purity (%) | > 95 % carbon nanotube (from TGA and TEM) > 97% wt % carbon content |
| Outside diameter(nm) | 20-30 (from HRTEM, Raman) |
| Inside diameter (nm) | 5-10 |
| Length (µm) | 10-30 (TEM) |
| SSA | >110 $m^2/g$ (BET) |
| Color | Black |
| Ash | < 1.5 wt% (TGA) |
| Electrical conductivity | >100 s/cm |
| Tap density | 0.28 $g/cm^3$ |
| True density | ~ 2.1 $g/cm^3$ |
| Multi-walled carbon nanotubes manufacturing method | CVD |

**CVD: Chemical vapor deposition, SSA: Specific surface area, TGA: Thermogravimetric Analysis, BET: Brunauer-Emmett-Teller surface area analysis, TEM: Transmission Electron Microscopy**




**شکل ۲- خصوصیات نانولوله‌های کربنی چند جداره. a- طیف رامان، b- تصویر میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM). c- تصویر میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM)، d- الگوی XRD (X-ray defraction)**

استفاده از یک آزمون مقدماتی تعیین شد. سپس با استفاده از آب‌مقطر غلظت‌های صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از نانولوله‌ی کربنی و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر از کربن فعال (جهت مقایسه آثار ایجادشده با شکل نانوی کربن) تهیه شد و پس از اولتراسونیک (۴۰ وات و به‌مدت ۳۰ دقیقه) (Elma, Ultrasonic S60H, Germany)، به‌صورت محلول‌پاشی بر اندام هوایی گیاه ریحان اعمال شد. تیمار اول یک ماه بعد از کشت گیاهچه‌ها یعنی در مرحله ۶-۸ برگی گیاه ریحان اعمال شد. پس از ۱۵ روز، دومین محلول‌پاشی نیز انجام و پس از دو هفته از دومین تیمار، اندام‌های هوایی برداشت شده و آنالیزهای بعدی روی آن انجام شد.

**تعیین میزان فنول کل**: محتوای فنول کل با استفاده از معرف فولین- سیوکالتئو تعیین شد (McDonald *et al.*, 2001). مقدار ۰/۱ گرم بافت تازه برگی در ۱ میلی‌لیتر متانول ساییده شد. محلول به‌دست آمده با کاغذ صافی، صاف شد. به ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره رقیق‌شده (۱:۱۰)، ۰/۵ میلی‌لیتر فولین رقیق‌شده (۱:۱۰ رقیق‌شده با آب‌مقطر) اضافه شد. پس از آن ۴۰۰ میکرولیتر سدیم کربنات یک مولار به مخلوط اضافه شد و نمونه‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق باقی ماندند؛ جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۷۶۵ نانومتر با استفاده از دستگاه

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-26 ]
[ DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.16.8 ]

اسپکتروفوتومتر UV-Visible (WPA S2100, UK) خوانده شد و درنهایت غلظت فنول در نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد گالیک اسید تعیین شد.

**تعیین میزان فلاونوئید کل**: برای سنجش این پارامتر، ۲۰ میکرولیتر عصاره متانولی به‌همراه ۷۵ میکرولیتر $NaNO_2$ پنج درصد به‌مدت ۵ دقیقه نگهداری شد. سپس ۱۵۰ میکرولیتر $AlCl_3$ ۱۰ درصد به محلول اضافه شد و به‌مدت ٦ دقیقه انکوبه شد. سپس به آن ۵۰۰ میکرولیتر سود یک مولار اضافه شد و پس از مخلوط‌کردن، جذب نوری آن در طول‌موج ۵۱۰ نانومتر خوانده شد. میزان کل فلاونوئید در عصاره به‌صورت میلی‌گرم معادل کوئرستین بیان شد (Chang *et al*., 2002).

**تعیین میزان پراکسید هیدروژن**: ۰/۳ گرم نمونه گیاهی در ۳ میلی‌لیتر تری‌کلرو استیک اسید (TCA) یک درصد هموژن گردید؛ سپس نمونه‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه در g ۱۲۰۰۰ و دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. سپس به ۰/۷۵ میلی‌لیتر از محلول رویی، ۰/۷۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار با pH معادل ۷ و ۱/۵ میلی‌لیتر یدید پتاسیم یک مولار اضافه شد. غلظت پراکسید هیدروژن نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول‌موج ۳۹۰ نانومتر و منحنی استاندارد آن در طیفی از صفر تا ۱۵ نانومول بر گرم وزن تر گیاه اندازه‌گیری شد (Loreto and Velikova, 2001).

**تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی با روش DPPH**: در این روش ابتدا ۰/۱ میلی‌لیتر محلول متانولی نمونه‌ها به‌همراه ۳/۹ میلی‌لیتر محلول متانولی DPPH در لوله‌های آزمایش مخلوط شد و پس از ۳۰ دقیقه، در دمای اتاق و در تاریکی جذب آنها در طول‌موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از اسپکتروفوتومتر خوانده شد. میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی با رابطه زیر محاسبه شد (Saha *et al*., 2004):

$A_I = (A-A_0/A_0) \times 100$ درصد مهار اکسیداسیون = $A_I$

جذب محلول حاوی مهارکننده اکسیداسیون = A، جذب محلول کنترل که در آن هیچ ترکیب مورد آزمایش (مانند عصاره یا استاندارد) وجود ندارد = $A_0$

**بررسی قدرت آنتی‌اکسیدانی – احیاکنندگی فریک FRAP**: در این سنجش واکنش‌گر FRAP از طریق مخلوط کردن بافر استات با TPTZ در هیدروکلریک اسید و $FeCl_3.6H_2O$ تولید شد. سپس جذب محلول‌های حاوی واکنش‌گر و غلظت‌های مختلف عصاره پس از ۱۵ دقیقه و در طول‌موج ۵۹۳ نانومتر اندازه‌گیری شد. واکنش‌گر FRAP به عنوان شاهد استفاده شد. از محلول آبی $FeSO_4.7H_2O$ با غلظت‌های مختلف برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد. مقدار FRAP برحسب میلی‌مول سولفات آهن بر گرم گیاه بیان شد (Galletti *et al*., 2005; Benzie and Strain, 1996).

**اندازه‌گیری آنتوسیانین کل**: با استفاده از روش Wagner (۱۹۷۹)، ۰/۰۵ گرم از بافت تازه برگ گیاه در ۱۰ میلی‌لیتر متانول اسیدی (متانول: هیدروکلریک اسید، ۱:۹۹ حجمی–حجمی) درون هاون چینی ساییده شد. مخلوط حاصل درون فالکون ریخته شد و به‌مدت ٢٤ ساعت در دمای اتاق در محیط تاریک قرار داده شد؛ عصاره حاصل با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد و جذب محلول رویی در طول‌موج ۵۵۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفوتومتر خوانده شد. آنتوسیانین کل با ضریب خاموشی (ε) معادل ۳۳۰۰۰ با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد:

$A = \varepsilon bc$

A، b و c به‌ترتیب نشان‌دهنده جذب نوری محلول، عرض کوت (سانتی‌متر) و غلظت محلول مدنظر (میلی‌گرم بر گرم) هستند.

**فعالیت آنزیم کاتالاز**: جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز از روش Aebi (۱۹۸٤)، استفاده شد. بدین ترتیب که ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات (۱۰۰ میلی‌مولار با pH= ٦/۸) با ۰/۵ میلی‌لیتر $H_2O_2$ (۳۰ میلی‌مولار) و عصاره آنزیمی مخلوط شد. کاهش جذب در طول‌موج ٢٤٠ نانومتر به‌مدت یک دقیقه اندازه‌گیری شد و فعالیت آنزیمی با فرمول زیر محاسبه گردید:

(mM/min) = (تغییرات جذب نوری / min) واحد آنزیمی (حجم مخلوط واکنش × (slope) ضریب خاموشی / 0.0436) $mM^{-1}\ cm^{-1}$)

**فعالیت آنزیم پراکسیداز**: فعالیت این آنزیم با استفاده از

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-26 ]

[ DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.16.8 ]

روش Upadhyaya (۱۹۸۵)، سنجیده شد. ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی به مخلوط واکنش آنزیمی شامل (بافر سدیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH= ۷، گایاکول ۱٪ و $H_2O_2$ ۱٪) اضافه شد. فعالیت آنزیمی به واسطه انجام واکنش اکسیداسیون به‌مدت یک دقیقه و در هر ۵ ثانیه در طول‌موج ۴۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

واحد آنزیمی (mM/min) = (تغییرات جذب نوری / min) ضریب خاموشی / (حجم مخلوط واکنش × (slope) 26.6 $mM^{-1}\ cm^{-1}$)

**فعالیت آنزیم پلی‌فنول اکسیداز**: فعالیت آنزیم پلی‌فنول اکسیداز با استفاده از روش Kar و Mishra (۱۹۷۶)، آنالیز گردید. مخلوط واکنش شامل ۱/۵ میلی‌لیتر بافر سدیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH=۷، ۱۰۰ میکرولیتر $H_2O_2$ ۲۰ میلی‌مولار، ۲۰۰ میلی‌لیتر پیروگالل ۲۰ میلی‌مولار و ۲۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. جذب مخلوط واکنش در طول‌موج ۴۲۰ نانومتر هر ۵ ثانیه به‌مدت یک دقیقه سنجیده شد و فعالیت آنزیمی به واسطه پورپوروگالین تولیدشده با فرمول زیر محاسبه شد:

واحد آنزیمی (mM/min) = (تغییرات جذب نوری / min) ضریب خاموشی / (حجم مخلوط واکنش × (slope) 2.47 $mM^{-1}\ cm^{-1}$)

**فعالیت آنزیم L- فنیل‌آلانین آمونیالیاز**: فعالیت این آنزیم با استفاده از روش Zucker (۱۹۶۵)، اندازه‌گیری شد؛ ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی به مخلوط واکنش حاوی بافر Tris–HCl (۵۰ میلی‌مولار و pH=۸) و ۰/۵ میلی‌لیتر L– فنیل‌آلانین ۱۰ میلی‌مولار اضافه شد. واکنش با اضافه‌کردن ۵۰ میکرولیتر کلریدریک اسید ۵ نرمال متوقف شد و فعالیت آنزیم در طول‌موج ۲۹۰ نانومتر با استفاده از منحنی استاندارد سینامیک اسید در غلظت‌های مشخص محاسبه شد.

**فعالیت آنزیم تیروزین آمونیالیاز (TAL)**: یک گرم از بافت تازه برگ ریحان در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد با ۳ میلی‌لیتر بافر تریس (۰/۰۵ مولار تریس–کلریدریک اسید با pH معادل ۸/٤) که حاوی ۱۵ میلی‌مولار ۲- مرکاپتواتانول بود به‌خوبی ساییده شد. پروتئین عصاره با استفاده از روش Bradford (۱۹۷٦) اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش حاوی ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی، L–تیروزین ۵/۵ میکرومولار، بافر تریس ۵۰۰ میکرومولار با pH برابر ۸/۱ که حجم نهایی یک میلی‌لیتر داشت، آماده شد و پس از ۷۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد واکنش تبدیل تیروزین به کوماریک اسید با اضافه‌نمودن ۰/۰۵ میلی‌لیتر کلریدریک اسید ۵ نرمال متوقف شد. فعالیت آنزیم TAL با تشکیل p-coumarate توسط اسپکتروفوتومتر در طول‌موج ۳۳۳ نانومتر اندازه‌گیری شد (Beaudoin – Eagan and Thorpe, 1985).

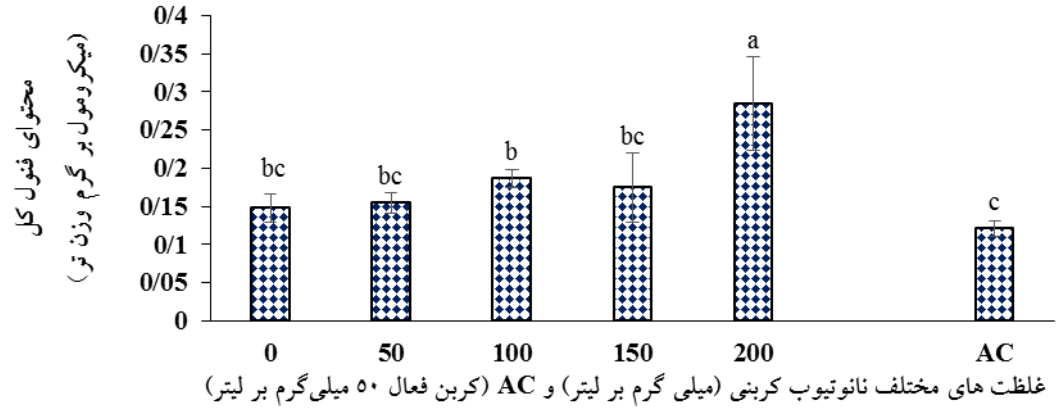
**محاسبات آماری**: این آزمایش به‌صورت طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد و محاسبات آماری داده‌های حاصل از آزمایش با استفاده از نرم‌افزار SPSS، نسخه ۲۲، انجام گرفت؛ برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel سری ۲۰۱٦ استفاده شد. در تمامی شکل‌ها بارهای عمودی نشان‌دهنده SE ± برای سه تکرار است.

## نتایج

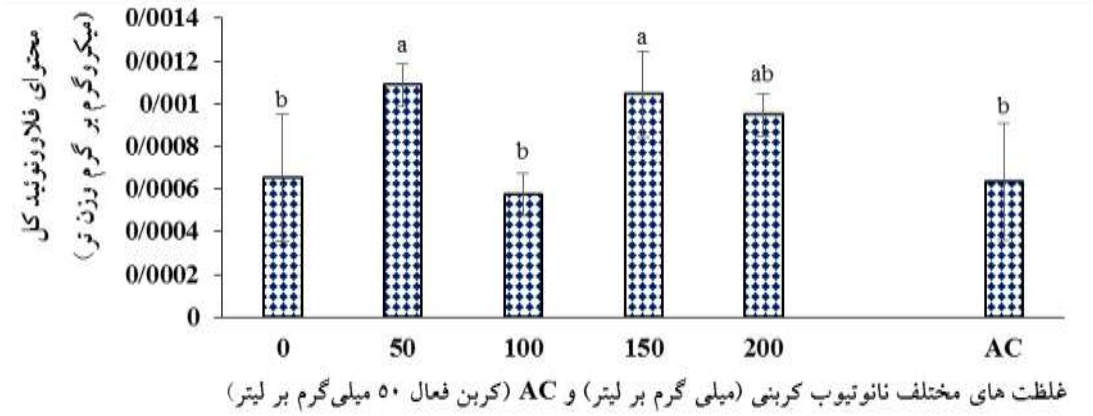
**محتوای فنول، فلاوونوئید و آنتوسیانین کل**: نتایج بررسی‌ها نشان داد اثر کاربرد نانولوله‌های کربنی چند دیواره بر میزان فنل کل در گیاه ریحان نسبت به نمونه‌های شاهد و کربن فعال دارای اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد بود. بیشترین میزان ترکیبات فنولی (۰/۲۸٤ میکرومول بر گرم وزن تر) در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانولوله‌ی کربنی و کمترین میزان (۰/۱۲۱ میکرومول بر گرم وزن تر) در تیمار کربن فعال مشاهده شد (شکل ۳). با توجه به نتایج تجزیه واریانس در سطح احتمال ۵ درصد، محتوای فلاوونوئید کل در نمونه‌های تیمارشده با نانولوله‌ی کربنی نسبت به نمونه‌های شاهد تغییرات معنی‌دار داشت. بیشترین میزان فلاوونوئید در غلظت ۵۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر از نانولوله‌ی کربنی و کمترین میزان در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد (شکل ٤). همچنین محتوای آنتوسیانین با افزایش غلظت نانولوله‌ی کربنی افزایش معنی‌داری نسبت به نمونه‌های شاهد نشان داد که بیشترین میزان آن (۰/۰۰۰۷۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-26 ]

[ DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.16.8 ]




**شکل ۳- تأثیر غلظت‌های مختلف نانولوله کربنی و کربن فعال بر میزان فنول کل گیاه ریحان. مقادیر، میانگین سه تکرار SE± است و حروف غیرمشابه ستون‌ها، معنی‌دار بودن میانگین داده‌ها براساس آزمون دانکن (P<0.05) را نشان می‌دهد.**



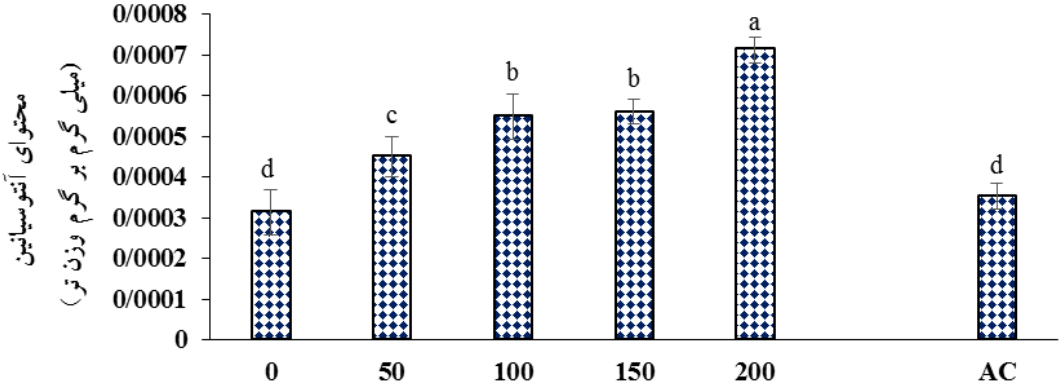

**شکل ٤- تأثیر غلظت‌های مختلف نانولوله کربنی و کربن فعال بر میزان فلاوونوئید کل گیاه ریحان. مقادیر، میانگین سه تکرار SE± است و حروف غیرمشابه ستون‌ها، معنی‌دار بودن میانگین داده‌ها براساس آزمون دانکن (P<0.05) را نشان می‌دهد.**

غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانولوله‌ی کربنی مشاهده شد (شکل ۵).

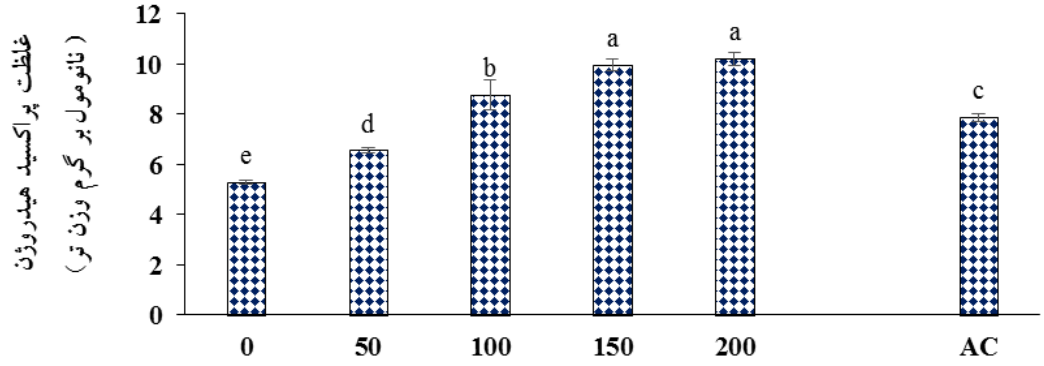
**فعالیت آنتی‌اکسیدانی و غلظت پراکسید هیدروژن**: با توجه به نتایج به‌دست آمده مشاهده شد با افزایش غلظت نانولوله‌ی کربنی محتوای پراکسید هیدروژن نیز افزایش معنی‌دار پیدا کرد؛ به‌طوری‌که بیشترین محتوای پراکسید هیدروژن در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانولوله‌ی کربنی (۱۰/۲ نانومول بر گرم وزن تر) و کمترین آن در حالت شاهد (۵/۲۷ نانومول بر گرم وزن تر) مشاهده شد (شکل ٦). همچنین نتایج نشان داد تیمارهای مختلف نانولوله‌ی کربنی اثر معنی‌دار بر مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و قدرت آنتی‌اکسیدانی- احیاکنندگی فریک (FRAP) داشت. بیشترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانولوله‌ی کربنی مشاهده شد (شکل ۷ و ۸).

**فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان**: با توجه به بررسی نتایج به‌دست آمده، با افزایش غلظت نانولوله‌ی کربنی، فعالیت آنزیم کاتالاز ابتدا یک کاهش در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نشان داد، پس از آن دوباره تا غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر افزایش داشت (شکل ۹). در مورد فعالیت آنزیم پلی‌فنول اکسیداز نیز ابتدا در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانولوله‌ی کربنی یک افزایش فعالیت مشاهده شد که پس از آن تا غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر فعالیت آنزیم کاهش نشان داد (شکل ۱۱).

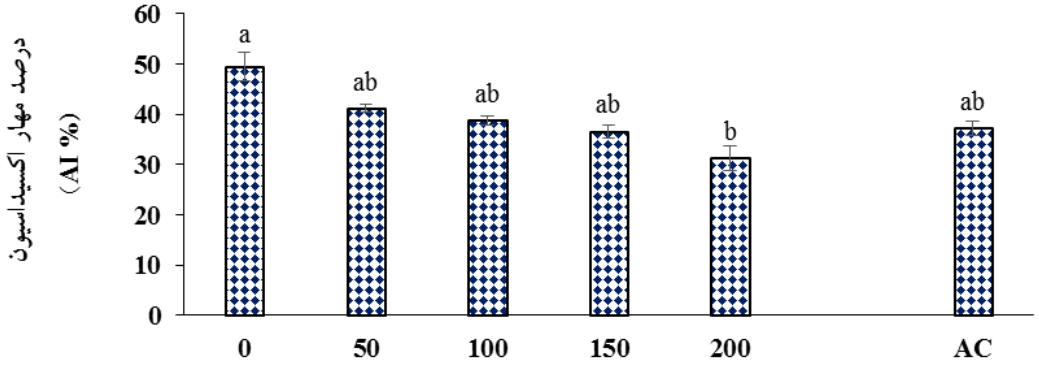
[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-26 ]
[ DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.16.8 ]




**شکل ۵- تأثیر غلظت‌های مختلف نانولوله کربنی و کربن فعال بر میزان آنتوسیانین گیاه ریحان. مقادیر، میانگین سه تکرار SE± است و حروف غیر مشابه ستون‌ها، معنی‌دار بودن میانگین داده‌ها براساس آزمون دانکن (P<0.05) را نشان می‌دهد.**



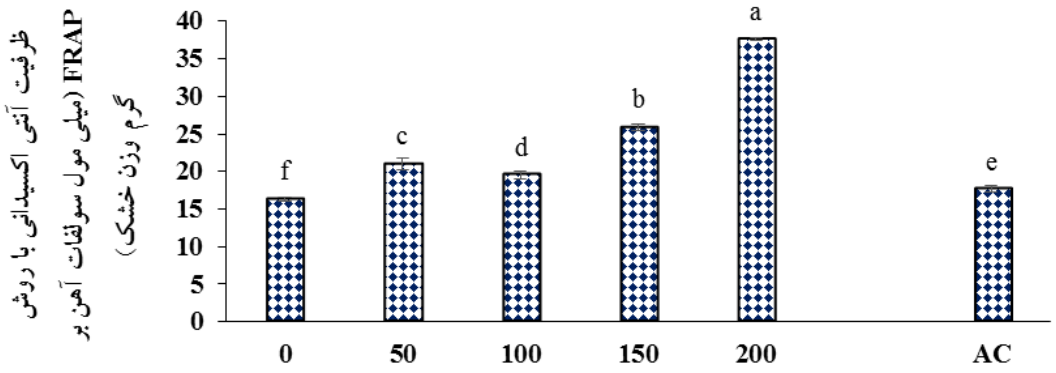

**شکل ٦- تأثیر غلظت‌های مختلف نانولوله کربنی و کربن فعال بر غلظت پراکسید هیدروژن گیاه ریحان. مقادیر، میانگین سه تکرار SE± است و حروف غیرمشابه ستون‌ها، معنی‌دار بودن میانگین داده‌ها براساس آزمون دانکن (P<0.05) را نشان می‌دهد**




**شکل ۷- تأثیر غلظت‌های مختلف نانولوله کربنی و کربن فعال بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH گیاه ریحان. مقادیر، میانگین سه تکرار SE± است و حروف غیرمشابه ستون‌ها، معنی‌دار بودن میانگین داده‌ها براساس آزمون دانکن (P<0.05) را نشان می‌دهد.**

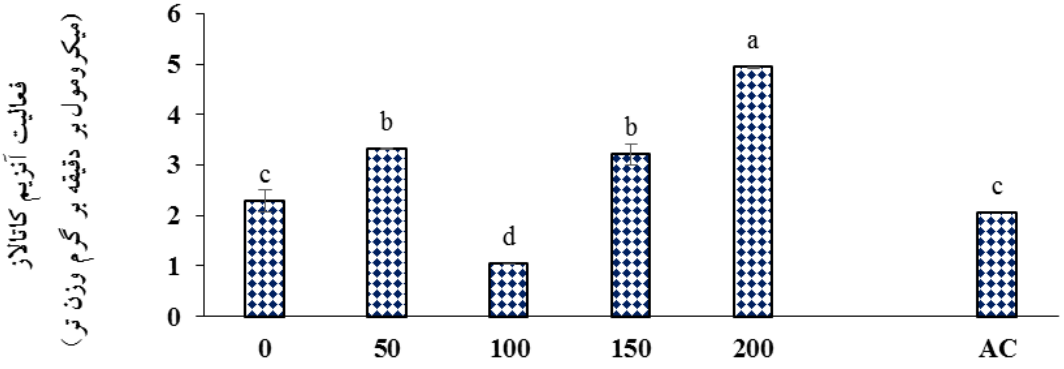
[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-26 ]

[ DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.16.8 ]



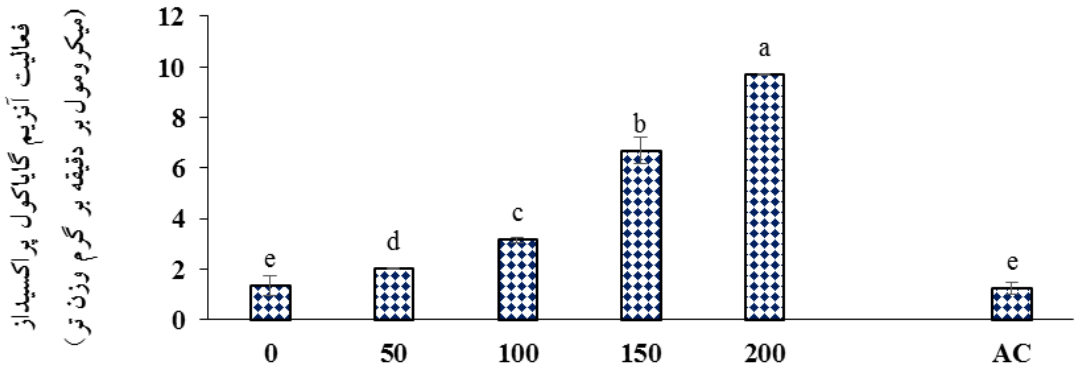

غلظت های مختلف نانوتیوب کربنی (میلی گرم بر لیتر) و AC (کربن فعال ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر)

**شکل ۸- تأثیر غلظت‌های مختلف نانولوله کربنی و کربن فعال بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به روش FRAP گیاه ریحان. مقادیر، میانگین سه تکرار SE± است و حروف غیرمشابه ستون‌ها، معنی‌دار بودن میانگین داده‌ها براساس آزمون دانکن (P<0.05) را نشان می‌دهد.**




غلظت های مختلف نانوتیوب کربنی (میلی گرم بر لیتر) AC (کربن فعال ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر)

**شکل ۹- تأثیر غلظت‌های مختلف نانولوله کربنی و کربن فعال بر فعالیت آنزیم کاتالاز گیاه ریحان. مقادیر، میانگین سه تکرار SE± است و حروف غیرمشابه ستون‌ها، معنی‌دار بودن میانگین داده‌ها براساس آزمون دانکن (P<0.05) را نشان می‌دهد.**

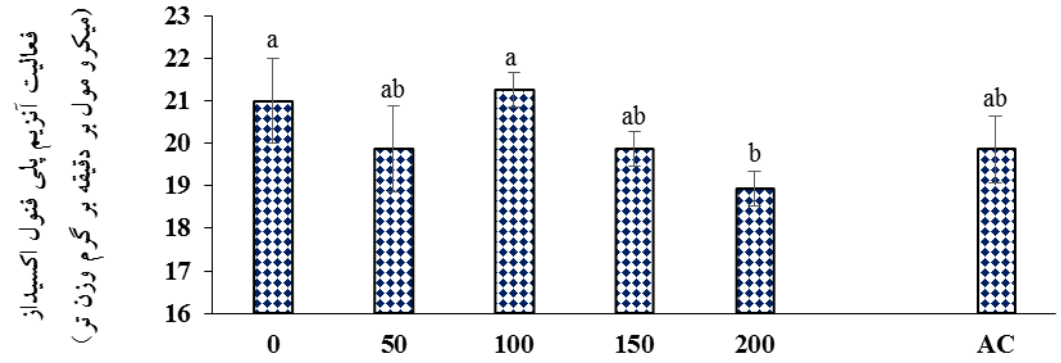



غلظت های مختلف نانوتیوب کربنی (میلی گرم بر لیتر) و AC (کربن فعال ۵۰ میلی گرم بر لیتر)

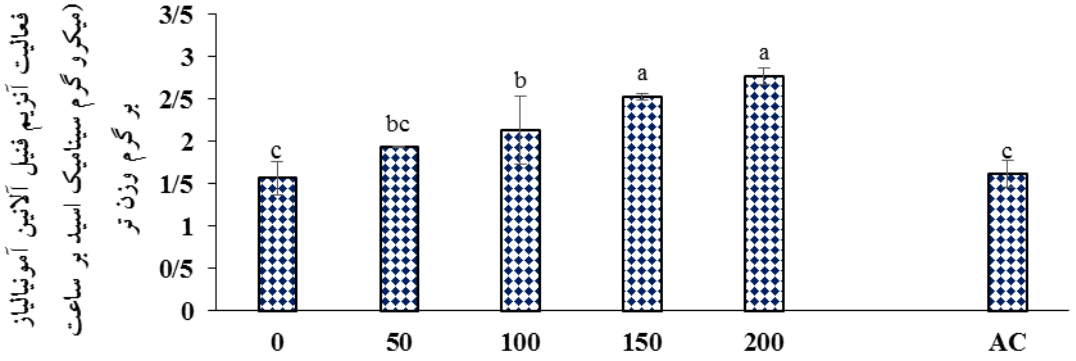
**شکل ۱۰- تأثیر غلظت‌های مختلف نانولوله کربنی و کربن فعال بر فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز گیاه ریحان. مقادیر، میانگین سه تکرار SE± است و حروف غیرمشابه ستون‌ها، معنی‌دار بودن میانگین داده‌ها براساس آزمون دانکن (P<0.05) را نشان می‌دهد.**

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-26 ]

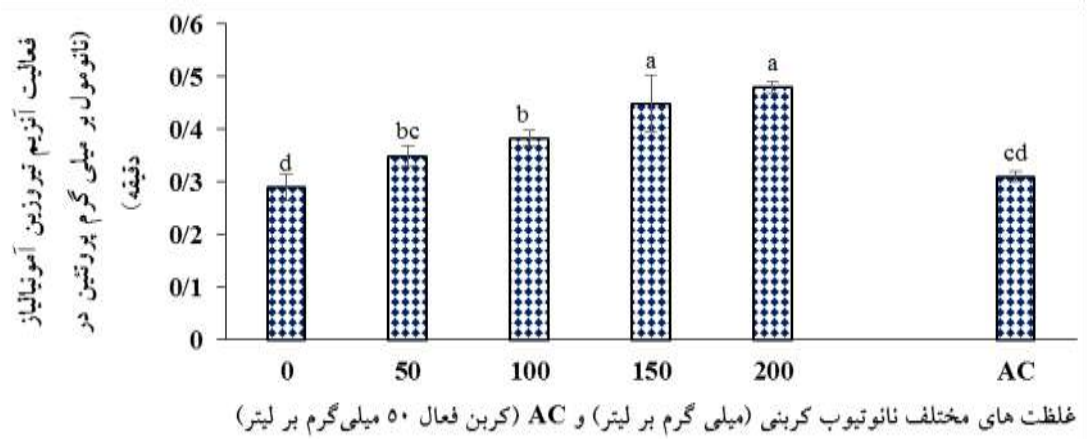
[ DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.16.8 ]




**شکل ۱۱- تأثیر غلظت‌های مختلف نانولوله کربنی و کربن فعال بر فعالیت آنزیم پلی‌فنول اکسیداز گیاه ریحان. مقادیر، میانگین سه تکرار ±SE است و حروف غیرمشابه ستون‌ها معنی‌دار بودن میانگین داده‌ها براساس آزمون دانکن (P<0.05) را نشان می‌دهد.**




**شکل ۱۲- تأثیر غلظت‌های مختلف نانولوله کربنی و کربن فعال بر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز گیاه ریحان. مقادیر، میانگین سه تکرار ±SE است و حروف غیرمشابه ستون‌ها معنی‌دار بودن میانگین داده‌ها براساس آزمون دانکن (P<0.05) را نشان می‌دهد.**




**شکل ۱۳- تأثیر غلظت‌های مختلف نانولوله کربنی و کربن فعال بر فعالیت آنزیم تیروزین آمونیالیاز گیاه ریحان. مقادیر، میانگین سه تکرار ±SE است و حروف غیر مشابه ستون‌ها معنی‌دار بودن میانگین داده‌ها براساس آزمون دانکن (P<0.05) را نشان می‌دهد.**

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-26 ]

[ DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.16.8 ]

فعالیت آنزیم پراکسیداز نیز با افزایش غلظت نانولوله‌ی کربنی افزایش یافت (شکل ۱۰).

فعالیت **آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز و تیروزین آمونیالیاز**: فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز و تیروزین آمونیالیاز با افزایش غلظت نانولوله‌ی کربنی افزایش نشان داد که این میزان در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به بیشترین میزان خود رسید (شکل ۱۲ و ۱۳).

## بحث

استفاده از الیسیتورهای زیستی و غیرزیستی و قرارگرفتن سلول‌های گیاهی تحت اثر محرک‌های مختلف، منجر به تغییر در فرایندهای متابولیکی و فعال‌شدن مسیرهای بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه می‌شود؛ بسیاری از محققان مشاهده کرده‌اند که استفاده از نانولوله‌های کربنی به‌عنوان الیسیتوری قدرتمند، شاخص‌های رشدی و فرایندهای متابولیکی گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهد. این مواد به‌دلیل ساختار، ابعاد و افزایش در سطح واکنش‌پذیری نسبت به ذرات بزرگ همین عنصر مانند کربن فعال، جذب و میان‌کنش با سیستم‌های زیستی را افزایش می‌دهند. Khodakovskaya و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند استفاده از نانولوله‌های کربنی چند دیواره باعث افزایش تولید زیست‌توده در گیاه گوجه‌فرنگی شد. در برخی از مطالعات مشخص شده است، استفاده از نانولوله‌های کربنی می‌تواند منجر به تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) شود (Tan *et al.*, 2009). اگرچه این گونه‌های فعال به‌عنوان مولکول‌های علامت‌رسان در فرایندهای رشدونمو گیاهی دخالت دارند، با این وجود می‌توانند منجر به تخریب سلولی و حتی مرگ آن شوند و این در صورتی است که تولید ROS از میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سلول فراتر رود. در واقع علامت‌رسانی اکسیداتیو یا ایجاد صدمه در سلول‌های گیاهی به توازن بین تولید ROS و فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی بستگی دارد (Tripathy and Oelmuller, 2012). در این پژوهش مشاهده شد با افزایش غلظت نانولوله‌ی کربنی تا ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، محتوای پراکسید هیدروژن (به‌عنوان یکی از ROSها) نیز افزایش یافته است. این ترکیب به‌عنوان یکی از ترکیبات پیام‌رسان می‌تواند منجر به فعال‌سازی و بیان ژن‌های دخیل در تولید متابولیت‌های ثانویه شود (Zhao *et al.*, 2005) که با نتایج حاصل از این پژوهش در افزایش ترکیبات فنولی و آنتوسیانین کل همخوانی دارد. افزایش محتوای فنولی با افزایش غلظت نانولوله‌های کربنی تا ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر می‌تواند به دلیل افزایش فعالیت آنزیم‌های فنیل‌آلانین آمونیالیاز و تیروزین آمونیالیاز باشد. زیرا افزایش فعالیت این دو آنزیم باعث افزایش تولید سینامیک اسید و کوماریک اسید می‌شود که پیش‌سازهای ترکیبات فنولی در مسیر فنیل پروپانوئید هستند. بیشترین میزان فلاوونوئید کل در غلظت ۵۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر از نانولوله‌ی کربنی مشاهده شد که تفاوت معنی‌دار با حالت شاهد و تیمار ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کربن فعال داشت. خاصیت آنتی‌اکسیدانی گیاه به میزان ترکیبات فنولی بستگی دارد. این ترکیبات از نظر صنعتی بسیار حائز اهمیت هستند و از طریق مسیر شیکیمات- فنیل‌پروپانوئید- فلاوونوئید ساخته می‌شوند (Osawa, 1994). با توجه به اهمیت این ترکیبات گیاهی در ساخت ترکیبات دارویی، استفاده از محرک‌هایی که باعث بالابردن میزان این ترکیبات در گیاه می‌شوند از درجه اهمیت بالایی برخوردار است.

روش‌های مختلفی جهت سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان وجود دارد که در این پژوهش علاوه بر سنجش محتوای فنولی تام، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از روش‌های رادیکال آزاد DPPH و قدرت آنتی‌اکسیدانی- احیاکنندگی فریک (FRAP) مورد آزمایش قرار گرفت. تست DPPH براساس واکنش ترکیباتی مانند فنول‌ها به‌عنوان دهنده هیدروژن با رادیکال آزاد DPPH و تست FRAP نیز براساس توانایی ترکیبات فنولی در احیای $Fe^{3+}$ به $Fe^{2+}$ است. به‌دلیل وجود تنوع در ترکیبات گیاهی، بهتر است از چند روش برای بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه استفاده شود تا معایب روش‌های مختلف پوشانده شود. در سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به روش FRAP مشاهده شد غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانولوله‌ی کربنی بیشترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-26 ]
[ DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.16.8 ]

را داراست که نشان‌دهنده بالارفتن غلظت ترکیبات آنتی‌اکسیدان مانند ترکیبات فنولی با افزایش غلظت نانولوله‌ی کربنی تا ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر است. همان‌طوری‌که مشاهده شد محتوای فنول کل با افزایش غلظت نانولوله‌ی کربنی افزایش نشان داده است که با افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدان در این غلظت همبستگی نشان می‌دهد. با توجه به نتایج به‌دست آمده از روش DPPH در بین سطوح مختلف نانولوله‌ی کربنی، از نظر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تفاوت اندکی وجود دارد و بین برخی غلظت‌ها معنی‌دار نیست. کمترین میزان IC50 مربوط به غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر است که بیشترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را نشان می‌دهد. با توجه به اینکه رادیکال DPPH بیشتر با ترکیبات حاوی گروه هیدروکسیل وارد واکنش می‌شود و با فلاوونوئیدهایی که در حلقه B خود هیدروکسیل ندارند و همچنین اسیدهای آروماتیک که حاوی تنها یک گروه هیدروکسیل باشند وارد واکنش نمی‌شود (Roginsky and Lissi, 2005). بنابراین دارای عملکرد اختصاصی‌تری است و نتیجه مشاهده‌شده می‌تواند به این دلیل باشد که احتمال دارد در سنجش انجام‌شده، جذب ترکیبات واکنش‌گر با DPPH در مدت زمان در نظر گرفته شده برای آزمایش تثبیت نشده باشد و نیاز به زمان بیشتری جهت تثبیت واکنش بوده است. Ghorbanpour و Hadian (۲۰۱۵) با بررسی اثر نانولوله‌ی کربنی چند دیواره بر فعالیت روبشی رادیکال آزاد DPPH و بتاکاروتن به این نتیجه رسیدند که غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانولوله‌ی کربنی باعث القای خاصیت آنتی‌اکسیدانی در عصاره کالوس مرزه خوزستانی شده که نتایج حاصل از این پژوهش با مطالعات آنان همخوانی دارد.

در این مطالعه با افزایش غلظت نانولوله‌ی کربنی، فعالیت القا شده دو آنزیم درگیر در متابولیسم فنیل پروپانوئید نیز مشاهده شد که علت تجمع ترکیبات فنولی و آنتوسیانین‌ها می‌تواند به‌دلیل القای فعالیت دو آنزیم PAL و TAL باشد. آنزیم PAL به‌عنوان یک آنزیم کلیدی در گیاهان، در نقطه آغازی مسیر بیوسنتزی فنیل پروپانوئیدها قرار دارد و دآمیناسیون غیراکسیداتیو فنیل‌آلانین به سینامیک اسید را کاتالیز می‌کند (Lin *et al.*, 2009). افزایش فعالیت این آنزیم در تیمارهای نانولوله‌ی کربنی نشان‌دهنده تأثیر این الیسیتور بر فعالیت این آنزیم و تأثیر بر میزان محتوای محصولات آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز است. همان‌طوری‌که مشاهده می‌شود با اثر این آنزیم میزان محتوای فنول و فلاونوئید کل در مقایسه با نمونه‌های شاهد افزایش نشان داده است؛ اینگونه به‌نظر می‌رسد که این دو آنزیم به‌عنوان تنظیم‌کنندگان تولید ترکیبات فنولی و آنتوسیانین‌ها، تحت تأثیر تحریکی نانولوله‌ی کربنی قرار گرفته و با فعال‌شدن پاسخ فوق حساسیتی گیاه و تولید رادیکال‌های آزاد به‌عنوان ترکیبات پیام‌رسان، باعث القای فعالیت این دو آنزیم و تولید متابولیت‌های ثانویه شده‌اند (Ghorbanpour and Hadian, 2015). نتایج پژوهش حاضر با یافته‌های Ghasempour و همکاران (۲۰۱۹) مبنی بر فعالیت القاشده آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز و غلظت‌های بالای ترکیبات فنولی در نمونه‌های تیمارشده با نانولوله‌ی کربنی در کالوس گیاه پروانش (*Catharanthus roseus*) همخوانی دارد. به‌طورکلی دو آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز و تیروزین آمونیالیاز، در مسیر بیوسنتز ترکیبات فنولی، آنزیم‌های تعیین‌کننده متابولیسم فنیل‌پروپانوئید هستند که از طریق دآمیناسیون فنیل‌آلانین و تیروزین به‌ترتیب منجر به تولید سینامیک اسید و کوماریک اسید می‌شوند و از این طریق پیش‌ساز ترکیبات فنولی تولید خواهد شد. اثر تحریکی نانولوله‌های کربنی بر فعالیت آنزیم‌های فنیل‌آلانین آمونیالیاز و تیروزین آمونیالیاز و افزایش محتوای فنول کل در این پژوهش می‌تواند همبستگی افزایش فعالیت این آنزیم‌ها در تولید ترکیبات فنولی با تحریک تولید پیش‌ساز این ترکیبات را نشان دهد.

با توجه به نتایج به‌دست آمده از فعالیت آنزیم کاتالاز مشاهده شد با افزایش غلظت نانولوله‌ی کربنی، میزان فعالیت این آنزیم نیز افزایش می‌یابد که می‌تواند به‌دلیل فعال‌شدن سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه در جهت جاروب‌کردن گونه‌های فعال اکسیژن اضافی باشد. در مورد آنزیم پراکسیداز نیز مشاهده می‌شود با افزایش غلظت نانولوله‌ی کربنی میزان فعالیت این آنزیم افزایش نشان داده است که می‌تواند به‌دلیل

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-26 ]

[ DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.16.8 ]

افزایش میزان گونه‌های فعال اکسیژن و فعال‌شدن آنزیم پراکسیداز باشد. در مورد آنزیم پلی‌فنول اکسیداز نیز کمترین میزان فعالیت آنزیم و بیشترین میزان فنول کل در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد. آنزیم پلی‌فنول اکسیداز قادر است ترکیبات فنولی را به ارتوکینون‌ها تبدیل کند (Amiot *et al.*, 1992; Coseteng and Lee, 1987). بنابراین زمانی که این آنزیم کمترین فعالیت را از خود نشان می‌دهد مشاهده می‌شود که محتوای فنولی در بیشترین حالت خود قرار گرفته است. همان‌طوری‌که Ghorbanpour و Hadian (۲۰۱۵) نیز نشان دادند استفاده از نانولوله‌ی کربنی چند دیواره در سطوح پایین (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)، باعث افزایش محتوای فنول کل، فلاونوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گیاه مرزه خوزستانی (*Satureja khuzestanica*) می‌شود. احتمالاً این تغییر در سنتز متابولیت‌های ثانویه می‌تواند به‌دلیل فعالیت آنزیم‌های مختلف مانند پراکسیداز، پلی‌فنول اکسیداز و فنیل‌آلانین آمونیالیاز باشد. همچنین Oloumi و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که استفاده از نانوذرات اکسید مس و اکسید روی می‌تواند منجر به افزایش ترکیبات فنولی در گیاه شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.) شود. Ahmadi و همکاران (۲۰۲۰) نیز نشان دادند محتوای فنول کل، فلاوونوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها تحت تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات $SiO_2$ افزایش پیدا می‌کند.

به‌طورکلی استفاده از نانولوله‌ی کربنی در این مطالعه به‌منظور بررسی چگونگی اثر این الیسیتور بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و محتوای فنول، فلاوونوئید و آنتوسیانین نشان داد، استفاده از این نانوماده می‌تواند منجر به افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، محتوای فنول و فلاوونوئید در این گیاه گردد. گیاه ریحان با داشتن ترکیبات دارویی ارزشمند از اهمیت بالایی برخوردار است و پیداکردن راهی در جهت افزایش میزان ترکیبات دارویی گیاهان ارزشمند با اثر بر مسیرهای بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه بسیار حائز اهمیت است. نتیجه مثبتی که این الیسیتور بر افزایش میزان فنول و فلاوونوئید گیاه ریحان داشته است، می‌تواند این زمینه را فراهم کند تا تحقیقات بیشتری در مورد اثر این الیسیتورها روی گیاهان مختلف دیگر با ترکیبات دارویی ارزشمند انجام گیرد؛ چرا که امروزه با توجه به رشد جمعیت، گسترش انواع بیماری‌ها و وجود اثرات ناخواسته و زیانبار داروهای شیمیایی، افزایش ترکیبات دارویی گیاهان با اثر بر مسیرهای متابولیسمی آن‌ها و تولید متابولیت‌هایی به‌صورت طبیعی بسیار حائز اهمیت است. همچنین تأثیری که نانولوله‌ی کربنی بر افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در گیاه ریحان نشان داد، می‌تواند این الیسیتور را به‌عنوان محرکی در افزایش توان مقاومتی گیاه در برابر تنش اکسیداتیو حاصل از تنش‌های زیستی و غیرزیستی معرفی کند.

## نتیجه‌گیری

از نتایج این تحقیق چنین بر می‌آید که استفاده از نانولوله‌ی کربنی به‌عنوان محرک، البته در غلظتی که برای گیاه بهینه باشد می‌تواند بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی مؤثر بوده و منجر به افزایش متابولیت‌های ثانویه گیاه شود. بیشترین میزان ترکیبات فنولی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در مقایسه با نمونه‌های شاهد و تیمار شده با کربن فعال، در نمونه‌های تیمار شده با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد.

## منابع

چگینی، الهه.، قربان‌پور، منصور.، حاتمی، مهرناز. و تقی‌زاده، م. (۱۳۹۵) اثر نانولوله‌های کربنی چند دیواره بر صفات فیزیولوژیکی، ترکیبات فنلی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه مریم‌گلی ایرانی (*Salvia mirzayanii*) تحت تنش خشکی. نشریه گیاهان دارویی ۶۲: ۲۰۷-۱۹۱.

Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. In Methods in Enzymology. Academic Press, San Diego.

Amiot, M. J., Tacchini, M., Aubert, S. and Nicolas, J. (1992) Phenolic composition and browning susceptibility of various apple cultivars at maturity. Journal of Food Science 57: 958-962.

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-26 ]

[ DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.16.8 ]

Ahmadi, N., Hassanpour, H., Hekmati, M. and Ghanbarzadeh, M. (2020) Effect of $SiO_2$ nanoparticles on phytochemical and anatomical alterations in *Anthemis gilanica*. Iranian Journal of Plant Physiology 10: 3223-3231.

Beaudoin-Eagan, L. D. and Thorpe, T. A. (1985) Tyrosine and phenylalanine ammonia lyase activities during shoot initiation in tobacco callus cultures. Plant Physiology 78: 438-441.

Benzie, I. F. and Strain, J. J. (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. Analytical Biochemistry 239: 70-76.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Canas, J. E., Long, M., Nations, S., Vadan, R., Dai, L., Luo, M., Ambikapathy, R., Lee, E. H. and Olszyk, D. (2008) Effects of functionalized and nonfunctionalized single-walled carbon nanotubes on root elongation of select crop species. Environmental Toxicology and Chemistry 27: 1922-1931.

Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M. and Chern, J. C. (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of Food and Drug Analysis 10: 178-182.

Coseteng, M. Y. and Lee, C. Y. (1987) Changes in apple polyphenol oxidase and polyphenol concentrations in relation to degree of browning. Journal of Food Science 52: 985-989.

Galletti, P., Di Gennaro, C. I., Migliardi, V., Indaco, S., Della Ragione, F., Manna, C. and Zappia, V. (2005) Diverse effects of natural antioxidants on cyclosporin cytotoxicity in rat renal tubular cells. Nephrology Dialysis Transplantation 20: 1551-1558.

Ghasempour, M., Iranbakhsh, A., Ebadi, M. and Ardebili, Z. O. (2019) Multi-walled carbon nanotubes improved growth, anatomy, physiology, secondary metabolism, and callus performance in *Catharanthus roseus*: An in vitro study. 3 Biotech 9: 404.

Ghorbanpour, M. and 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.

Hatami, M. and Ghorbanpour, M. (2014) Defense enzyme activities and biochemical variations of *Pelargonium zonale* in response to nanosilver application and dark storage. Turkish Journal of Biology 38: 130-139.

Javanmardi, J., Khalighi, A., Kashi, A., Bais, H. P. and Vivanco, J. M. (2002) Chemical characterization of basil (*Ocimum basilicum* L.) found in local accessions and used in traditional medicines in Iran. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50: 5878-5883.

Kar, M. and Mishra, D. (1976) Catalase, peroxidase and polyphenol oxidase activities during rice leaf senescence. Plant Physiology 57: 315-319.

Khodakovskaya, M. V., De Silva, K., Biris, A. S., Dervishi, E. and Villagarcia, H. (2012) Carbon nanotubes induce growth enhancement of tobacco cells. ACS Nano 6: 2128-2135.

Khodakovskaya, M. V., Kim, B. S., Kim, J. N., Alimohammadi, M., Dervishi, E., Mustafa, T. and Cernigla, C. E. (2013) Carbon nanotubes as plant growth regulators: Effects on tomato growth, reproductive system, and soil microbial community. Small 9: 115-123.

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

Lin, C., Fugetsu, B., Su, Y. and Watari, F. (2009) Studies on toxicity of multi-walled carbon nanotubes on Arabidopsis T87 suspension cells. Journal of Hazardous Materials 170: 578-583.

Loreto, F. and Velikova, V. (2001) Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. Plant Physiology 127: 1781-1787.

McDonald, S., Prenzler, P. D., Antolovich, M. and Robards, K. (2001) Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. Food Chemistry 73: 73-84.

Mondal, A., Basu, R., Das, S. and Nandy, P. (2011) Beneficial role of carbon nanotubes on mustard plant growth: An agricultural prospect. Journal of Nanoparticle Research 13: 4519.

Oloumi, H., Soltaninejad, R. and Baghizadeh, A. (2015) The comparative effects of nano and bulk size particles of CuO and ZnO on glycyrrhizin and phenolic compounds contents in *Glycyrrhiza glabra* L. seedlings. Indian Journal of Plant Physiology 20: 157-61.

Nel, A., Xia, T., Madler, L. and Li, N. (2006) Toxic potential of materials at the nanolevel. Science 311: 622-627.

Osawa, T. O. S. H. I. H. I. K. O. (1994) Novel natural antioxidants for utilization in food and biological systems. Postharvest Biochemistry of Plant Food-Materials in the Tropics 1: 241-251.

Roginsky, V. and Lissi, E. A. (2005) Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. Food Chemistry 92: 235-254.

Salata, O. V. (2004) Applications of nanoparticles in biology and medicine. Journal of Nanobiotechnology 2: 3.

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-26 ]

[ DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.16.8 ]

Saha, K., Lajis, N. H., Israf, D. A., Hamzah, A. S., Khozirah, S., Khamis, S. and Syahida, A. (2004) Evaluation of antioxidant and nitric oxide inhibitory activities of selected Malaysian medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology 92: 263-267.

Tan, X. M., Lin, C. and Fugetsu, B. (2009) Studies on toxicity of multi-walled carbon nanotubes on suspension rice cells. Carbon 47: 3479-3487.

Tiwari, D. K., Dasgupta-Schubert, N., Cendejas, L. V., Villegas, J., Montoya, L. C. and Garcia, S. B. (2014) Interfacing carbon nanotubes (CNT) with plants: Enhancement of growth, water and ionic nutrient uptake in maize (*Zea mays*) and implications for nanoagriculture. Applied Nanoscience 4: 577-591.

Tripathy, B. C. and Oelmuller, R. (2012) Reactive oxygen species generation and signaling in plants. Plant Signaling and Behavior 7: 1621-1633.

Upadhyaya, A., Sankhla, D., Davis, T. D., Sankhla, N. and Smith, B. N. (1985) Effect of paclobutrazol on the activities of some enzymes of activated oxygen metabolism and lipid peroxidation in senescing soybean leaves. Journal of Plant Physiology 121: 453-461.

Villagarcia, H., Dervishi, E., de Silva, K., Biris, A. S. and Khodakovskaya, M. V. (2012) Surface chemistry of carbon nanotubes impacts the growth and expression of water channel protein in tomato plants. Small 8: 2328-2334.

Wagner, G. J. (1979) Content and vacuole/extravacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanin in protoplasts. Plant Physiology 64: 88-93.

Zhang, R., Zhang, Y., Zhang, Q., Xie, H., Qian, W. and Wei, F. (2013) Growth of half-meter long carbon nanotubes based on Schulz–Flory distribution. Acs Nano 7: 6156-6161.

Zhao, J., Davis, L. C. and Verpoorte, R. (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnology Advances 23: 283-333.

Zucker, M. (1965) Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. Plant Physiology 40: 779.

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-26 ]

[ DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.16.8 ]

# The effect of treatment with Multi-walled Carbon Nanotube as an elicitor in increasing the activity of antioxidant system and phenolic content of basil (*Ocimum basilicum* L.)

**Roghaieh Holghoomi[1], Siavash Hosseini Sarghein*[1], Jalil Khara[1], Bahman Hosseini[2]**

**[1]Biology Department, Faculty of science, Urmia University, Urmia**
**[2] Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran**
**(Received: 18/10/2020, Accepted: 26/01/2021)**

**Abstract**

The present study was conducted to investigate the effects of different concentrations of multi-walled carbon nanotubes (0, 50, 100, 150 and 200 mg / l in distilled water) and activated carbon on total phenolics and flavonoid content, antioxidant activity, hydrogen peroxide content, anthocyanin, as well as activity of catalase, peroxidase, polyphenol-oxidase, L-phenylalanine ammonia-lyase, and tyrosine ammonia-lyase in a factorial completely randomized design with three replications. In this study, activated carbon treatment was used to investigate the effects of carbon nanotubes and compare them with the usual form of carbon. The results of data analysis showed that by increasing the concentration of carbon nanotubes, the content of hydrogen peroxide, phenolics, anthocyanin and antioxidant capacity increased compared to the control and activated carbon treatments. The highest flavonoid content was observed at concentrations of 50 and 150 mg / l carbon nanotubes (0.001088 and 0.001045 µg / g fresh weight, respectively). Also, the activity of the L-Phenylalanine ammonia-lyase enzyme showed a slight increase with the increasing concentration of carbon nanotubes. Among the antioxidant enzymes, catalase and peroxidase increased their activity by increasing the concentration of carbon nanotubes. In this study, the activated carbon treatment showed the same behavior as the control. In general, the results of this study indicated that the use of carbon nanotubes as an elicitor has increased the antioxidant capacity of basil and, on the other hand, increased the content of phenolic compounds.

**Keywords:** Activated carbon, Antioxidant capacity, Multi-walled carbon nanotube, Phenolic compounds content, Phenylalanine ammonialyase enzyme.

Corresponding author, Email: siavash.hosseini19@gmail.com

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-26 ]

[ DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.42.16.8 ]