Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

Evaluation of the effect of carbon nanoparticles on the proliferation of calli of date palm (*Majol cultivar*)

Sadaf Abedi

MSc Student, Department of Plant Production, Faculty of Agriculture Science and Natural Resources, Gonbad Kavous University, Gonbad-e Kavus, Iran. E-mail address: sadafabedi866@gmail.com

Leila Ahangar

*Corresponding author. Assistant professor, Department of Plant Production, Faculty of Agriculture Science and Natural Resources, Gonbad Kavous University, Gonbad-e Kavus, Iran. E-mail address: L.ahangar63@gmail.com

Reza Zarghami

Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research Education and Extension Organization, Karaj, Iran. E-mail address: rezazarghami2001@yahoo.com

Leila Mamani

Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research Education and Extension Organization, Karaj, Iran. E-mail address: leila.mamani@abrii.ac.ir

Masoumeh Naeemi

Assistant professor, Department of Plant Production, Faculty of Agriculture Science and Natural Resources, Gonbad Kavous University, Gonbad-e Kavus, Iran. E-mail address: Naeemi_701@yahoo.com

Abstract

Objective

Nanotechnology, as a promising method for addressing sustainable agricultural issues, can increase propagation efficiency in palm tissue culture. This study aimed to prepare carbon nanoparticles and use the resulting nanocomposites to evaluate their efficiency in improving and increasing date callus formation.

Materials and methods

Three separate experiments were performed to propagate calluses consisting of meristematic microsamples of dates. In the first experiment, calli prepared in MS culture medium were

transferred to four culture media with different hormonal treatments from NAA and 2iP, and in the second experiment, calli composed of meristematic date microsamples in MS culture medium were transferred to four culture media with separate treatments from NAA and BAP. Different hormones were transferred from NAA and BAP. In the third experiment, after determining the best hormonal treatments from the first and second experiments, carbon nanoparticles were synthesized from graphite, and calli composed of meristematic date microsomal samples were recreated in superior culture media with different concentrations of nanoparticles (0, 10, 20, 30, 40, 50 mg/L).

Results

Based on the results of the first experiment, treatments of 10 mg/L NAA + 30 mg/L 2ip and 0.1 mg/L NAA + 0.05 mg/L 2ip were selected as the best callus propagation treatments. In the second experiment, it was found that there was no statistically significant difference between the applied treatments of 10 mg/L NAA + 30 mg/L BAP and 10 mg/L NAA + 10 mg/L BAP with other treatments with different concentrations of BAP. The results of the third experiment showed that the use of 10 mg/L NAA + 30 mg/L BAP + 30 mg/L CNP can produce the most calluses.

Conclusions

Due to the positive effect of carbon nanoparticles on increasing the weight of commodities, treatment of 10 mg/L NAA + 30 mg/L BAP + 30 mg/L CNP becomes the most suitable option for calorific cultivar propagation.

Keywords: Dates, Nanotechnology, Tissue culture, Carbon nanoparticles

Paper Type: Research Paper.

Citation: Abedi S, Ahangar L, Zarghami R, Mamani L, Naeemi M (2022) Evaluation of Effect of Carbon Nanoparticles on the Proliferation of Calli of date palm (*Majol cultivar*). *Agricultural Biotechnology Journal* 14 (4), 21-44.

Agricultural Biotechnology Journal 14 (4), 21-44. DOI: 10.22103/jab.2022.19357.1397

Received: July 22, 2022. Received in revised form: September 12, 2022.

Accepted: September 13, 2022. Published online: November 15, 2022

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
شاپا چاپی: ۲۲۲۸-۶۷۰۵ شاپا الکترونیکی: ۲۲۲۸-۶۵۰۰

ارزیابی اثر نانوذرات کربنی بر تکثیر کالوس‌های معمولی خرمای مجول

صدف عابدی

دانشجوی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه تولیدات گیاهی، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبدکاووس، ایران. رایانامه: sadafabedi866@gmail.com

لیلا آهنگر

*نویسنده مسئول: استادیار گروه تولیدات گیاهی، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبدکاووس، ایران. رایانامه: l.ahangar63@gmail.com

رضا ضرغامی

عضو هیئت علمی پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی(ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، کرج، ایران. رایانامه: rezazarghami2001@yahoo.com

لیلا مأمنی

عضو هیئت علمی پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی(ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، کرج، ایران. رایانامه: leila.mamani@abrii.ac.ir

معصومه نعیمی

استادیار گروه تولیدات گیاهی، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبدکاووس، ایران. رایانامه: Naeemi701@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۳۱ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۱/۰۶/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۲۲

چکیده

هدف: فناوری نانو به عنوان یک روش امیدوارکننده برای پرداختن به مسائل کشاورزی پایدار، می‌تواند موجب افزایش کارآیی تکثیر در کشت بافت خرما گردد. هدف این مطالعه تهیه نانوذرات کربنی و و ارزیابی کارایی استفاده‌ی آن‌ها در محیط کشت MS و اثر آن ها در بهبود و افزایش کالوس‌زایی خرما می باشد.

مواد و روش‌ها: جهت تکثیر کالوس‌های تشکیل شده از ریز نمونه‌های مریستمی خرمای مجول سه آزمایش مجزا با غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد NAA، 2ip، BAP و همچنین غلظت‌های مختلف نانوذرات کربنی (CNP) با ۵ تکرار بر تکثیر کالوس‌های خرمای رقم مجول انجام گردید. کالوس‌های تهیه شده در محیط کشت MS در آزمایش اول به چهار محیط کشت با تیمارهای مختلف هورمونی از NAA و 2ip و در آزمایش دوم به چهار محیط کشت با تیمارهای مختلف هورمونی از NAA و BAP انتقال داده شدند. در آزمایش سوم پس از تعیین بهترین تیمارهای هورمونی از آزمایش اول و دوم، سنتز نانو ذره کربنی از گرافیت انجام شد و مجدد کالوس‌های تشکیل شده از ریز نمونه‌های مریستمی خرما در محیط کشت‌های برتر همراه با غلظت‌های مختلف نانوذرات (۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ میلی‌گرم در لیتر) قرار گرفتند.

نتایج: بر اساس نتایج آزمایش اول تیمارهای ۱۰ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۳۰ میلی‌گرم در لیتر 2ip و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر 2ip به عنوان تیمارهای برتر تکثیر کالوس انتخاب گردیدند. در آزمایش دوم مشخص گردید که میان تیمارهای اعمال شده ۱۰ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۳۰ میلی‌گرم در لیتر BAP و تیمار ۱۰ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۱۰ میلی‌گرم در لیتر BAP با دیگر تیمارهای دارای غلظت‌های مختلف BAP، از نظر آماری اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. نتایج آزمایش سوم نشان داد که استفاده از تیمار ۱۰ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۳۰ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۳۰ میلی‌گرم در لیتر CNP می‌تواند تولید کالوس‌هایی با بیشترین وزن را در پی داشته باشد.

نتیجه‌گیری: با توجه به اثر مثبت نانوذرات کربنی در افزایش وزن کالوس‌ها، تیمار ۱۰ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۳۰ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۳۰ میلی‌گرم در لیتر CNP مناسب‌ترین گزینه برای تکثیر کالوس خرمای رقم مجول محسوب می‌شود.

کلیدواژه‌ها: خرما، فناوری نانو، کشت بافت، نانوذرات کربنی.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: عابدی صدف، آهنگر لیلا، ضرغامی رضا، مأمنی لیلا، نعیمی معصومه (۱۴۰۱) ارزیابی اثر نانوذرات کربنی بر تکثیر کالوس‌های معمولی خرمای مجول. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۴(۴)، ۴۴-۲۱.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مقدمه

با افزایش روزافزون جمعیت و کاهش سطح اراضی قابل کشت در عصری که با تغییرات اقلیم روبه‌رو است، سیستم‌های کشاورزی جهانی با چالش‌های متعدد و بی‌سابقه‌ای در سطح جهانی مواجه بوده، که لزوم استفاده از فناوری را در کشاورزی ضروری

می نماید. نانوتکنولوژی با افزایش کارایی نهاده‌ها و به حداقل رساندن تلفات به بهبود تولیدات کشاورزی کمک می‌کند. بنابراین به منظور دستیابی به امنیت غذایی، مهندسی نانو، ابزار مفیدی برای افزایش تولیدات کشاورزی پایدار می‌باشد (Shang et al. 2019; Alvarez et al. 2019). از طرفی، نانوتکنولوژی یک حوزه علمی چندرشته‌ای است که مجموعه‌ای از ابزارها و تکنیک‌های برگرفته از مهندسی، فیزیک، شیمی و زیست‌شناسی را به کار می‌گیرد (Mohammadabadi et al. 2009; Heidarpour et al. 2011; Mohammadabadi and Mozafari 2018). پیشرفت‌های علم نانو و فناوری نانو، ساخت و شناسایی حامل‌های زیست فعال زیر میکرونی را به صورت معمول امکان‌پذیر کرده است. تحویل مواد فعال زیستی به نقاط هدف در داخل بدن و رفتار آزادسازی آن‌ها مستقیماً تحت تأثیر اندازه ذرات است (Mortazavi et al. 2005; Zarrabi et al. 2020). در مقایسه با حامل‌های اندازه میکرومتر، نانوحامل‌ها مساحت سطح بیشتری را فراهم می‌کنند و پتانسیل افزایش حلالیت، افزایش فراهمی زیستی، بهبود رهاسازی کنترل‌شده و امکان هدف‌گیری دقیق مواد محبوس‌شده را به میزان بیشتری دارند (Heidarpour et al. 2011; Mohammadabadi and Mozafari 2019). مواد در مقیاس نانو نسبت حجم به سطح بالایی را ارائه می‌دهند که کاربرد آن‌ها را در بخش‌های مختلف و کشاورزی بهبود می‌بخشد. استفاده از نانو ذرات بر روی گیاهان و بررسی تعامل آن‌ها با گیاهان به توسعه نانوذرات و نانوبیوسنسورها کمک نمود و می‌تواند گامی به سوی کشاورزی پایدار باشد (Saxena et al. 2020). طبیعت دوستی و زیست سازگاری نانو مواد کربنی و همچنین دستورزی ساده‌تر موجب گردیده است که طیف کاربرد نانو مواد کربنی در کشاورزی افزایش پیدا کند. در سال‌های اخیر، به دلیل خواص مکانیکی، حرارتی و شیمیایی خاص و همچنین پایداری بالا نانو مواد کربنی، استفاده از آن‌ها به‌عنوان تنظیم‌کننده رشد گیاه، ریز مغذی‌ها، نانو علف‌کش‌ها، نانو آفت‌کش‌ها، نانوحسگرهای تشخیص آفات و حامل‌های مواد مغذی در کشاورزی، بطور گسترده انجام گرفته است. با استفاده از نانو ذرات می‌توان موجب حذف آلودگی‌های میکروبی، القای کالوس، اندام‌زایی، جنین‌زایی غیرجنسی، تنوع سوماکلونی و تولید متابولیت ثانویه از گیاه موردنظر گردید (Duhan et al. 2017; Kim 2017; Zaytseva and Neumann 2016; Chhipa 2016; Fraceto et al. 2016; Sarmast and Salehi 2016; Morsy et al. 2014; Khadri al. 2013).

اهمیت اقتصادی بالای خرما در خاورمیانه، موجب شده است که این گیاه بسیار مورد توجه قرار بگیرد. طبق آمار جهانی فائو در سال ۲۰۲۰ کشور مصر رتبه اول تولید را در سطح جهانی داشته و پس از آن عربستان سعودی و سپس ایران با تولید ۱۲۸۳۴۹۹ تن قرار دارند (http://www.fao.org). قدیمی‌ترین روش تکثیر نخل خرما، تکثیر جنسی از طریق بذر است. با این حال، این روش سنتی برای دستیابی به اهداف تجاری مناسب نیست. در عوض، استفاده از پاجوش، روش رایج برای تکثیر نخل خرما است اما این روش هم با محدودیت‌هایی همراه است (Khierallah et al. 2017). تکنیک کشت بافت ثابت کرده است که برای تکثیر سریع نخل خرما به جای روش‌های مرسوم و سنتی، کارآمدتر و مناسب‌تر است و می‌تواند تولید گیاهان صحیح و مناسب از ارقام برتر را تضمین نماید (Abahmane 2017). با وجود اینکه تکثیر نخل خرما از طریق کشت بافت، پتانسیل بالایی در تولید

گیاهان دارد، موفقیت این تکنیک به چند عامل از جمله: ژنوتیپ، نوع ریزنمونه، تنظیم‌کننده‌های رشـــد گیاهی (PGRs[1]) و عوامل دیگر بستگی دارد (Al-Khayri 2011; Al-Khayri 2010).

کشت بافت خرما از طریق دو روش مختلف انجام می شود: اندام‌زایی مستقیم و جنین‌زایی غیرجنسی که هر کدام از مزایا و معایبی برخوردارند (Rad et al. 2015). جنین‌زایی غیرجنســی روشــی برای تولید مثل غیرجنســی اســت که به طور طبیعی در گونه‌های مختلف گیاهی مشاهده شده، ضمن اینکه امروزه، به طور گسترده‌تر برای تکثیر و باززایی گیاهان مختلف استفاده می‌شود. این روش در برخی از مسـیرهای رشــدی و فیزیولوژیکی با جنین‌زایی جنســی مشــابه اســت (Salaün et al. 2021). مراحل جنین‌زایی غیرجنسی عبارتند از: القای کالوس‌های جنین‌زا، تشکیل جنین غیرجنسی، جوانه‌زنی جنین‌های غیرجنسی و تبدیل آن‌ها به گیاهچه. در همین راستا نانوتکنولوژی می‌تواند یک روش کارآمد برای افزایش میزان باززایی گیاهان باشد.

اثرات آزمایشگاهی نانولوله‌های کربنی (CNTs[2]) در کشت آزمایشگاهی نخل خرما نشان داد که CNTها در تمام مراحل ریزازدیادی نخل خرما تأثیر گذارند. همچنین مشــخص گردید که نانولوله‌های کربنی وزن‌تر کالوس را افزایش داده و تعداد جنین‌ها را در مقایســـه با شـــاهد کاهش می‌دهند. با این حال، تعداد جنین‌های جوانه زده افزایش یافته و افزایش قابل توجهی در طول شاخساره و تعداد برگ در مرحله افزایش طولی مشاهده شد. علاوه بر این، تعداد ریشه، طول ریشه و طول گیاهچه افزایش یافت. همچنین نتایج نشان داده است که CNTها می‌توانند جذب مواد مغذی از قبیل میزان نیتروژن، فسفر، پتاسیم و کلسیم را در گیاه افزایش داده و ضمن کاهش درصد سدیم، موجب افزایش غلظت کلروفیل کل، a و b شوند (Taha et al. 2016). در مطالعه‌ی دیگری به منظور بررسی اثرات سولفات مس ($CuSO_4$) و نیترات نقره ($AgNO_3$) و نانوذرات آن‌ها، مشخص شد که نانو ذرات $CuSO_4$ و $AgNO_3$ کاندیدهای بالقوه‌ای برای تقویت جنین‌زایی غیرجنســـی و باززایی ریزنمونه‌های جنین بالغ گندم هســـتند (Malik et al. 2021). مشـاهدات نشـان داد که بالاترین درصـد جنین‌زایی غیرجنسـی موز در محیط MS حاوی ١٠٠mg/L نانوذرات روی بدست آمد (Helaly et al. 2014). نتایج مطالعه برروی نعناع چمنی نشان داد که نانوذرات نقره (٣٠mg/L) و نانو ذرات نقره–طلا (١: ٢ و ٢: ١) در ترکیب با NAA (٢mg/L) موجب بهبود تکثیر کالوس (١٠٠٪) در مقایســه با شــاهد (٩٥ درصد) گردیدند (Fazal et al. 2016). قهوه‌ای شدن ارکیده چینی در روش تکثیر آزمایشگاهی، به طور موثری توسط نانوذرات گرافن به عنوان یک نانوذره بر پایه کربن، مهار گردید (Wu et al. 2018). همچنین نانو ذرات کربنی می‌توانند به طور قابل توجهی علائم تنش خشـکی ناشـی از افزودن سـدیم کلرید (NaCl) به محیط کشـت را کاهش دهند (Pandey et al. 2018). بکارگیری فناوری نانو می‌تواند یک نوآوری بزرگ در کشاورزی باشد. بررسی تحقیقات پیشین نشان می‌دهد که نانوذرات بسته به غلظت استفاده شده می‌تواند بر روی القای کالوس، تکثیر کالوس، جنین‌زایی و گیاهچه تاثیرات متفاوت مثبت یا منفی داشته باشد

[1] Plant Growth Regulators
٢ Carbon nano tube

که لزوم بررسی و تحقیق بر روی نحوه مکانیسم عمل نانوذرات را بیش از پیش نشان می‌دهد (Chhipa 2017a, b; Chhipa and Joshi 2016; Solanki et al. 2015). لذا با توجه به اهمیت افزایش تولید خرما با روش کشت بافت، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر نانوذرات کربنی و تهیه دستورالعملی کارآمد جهت افزایش تکثیر کالوس خرمای مجول انجام گردید.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر در سال ۱۴۰۰-۱۳۹۸ در آزمایشگاه پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (کرج)، محمد شهر انجام گردید.

مواد گیاهی: پاجوش‌های خرمای وارداتی رقم مجول ۴-۲ ساله تهیه شده از اهواز از درختان مادر جدا شدند سپس برگهای بیرونی برداشته شد و قسمتی از ساقه که حاوی مریستم است جدا گردید و بلافاصله در محلول آنتی اکسیدانی سرد تشکیل شده از اسید اسکوربیک و سیتریک، هر کدام به مقدار ۱۵۰ میلی گرم در لیتر قرار گرفت. ساقه حاوی مریستم به طول حدود ۸ سانتی‌متر جهت استریل سطحی در اتانول ۷۰ درصد (یک دقیقه) قرار گرفت و به دنبال آن در هیپوکلریت سدیم ۱/۶ درصد **w/v** حاوی ۰/۱ میلی‌لیتر محلول ضدعفونی کننده توین ۲۰ درصد (۱۵ دقیقه) قرار داده شد. سپس چهار بار با آب مقطر استریل شسته شد و دوباره در محلول آنتی اکسیدان استریل قرار گرفت تا از قهوه‌ای شدن ساقه حاوی مریستم جلوگیری شود. بافت‌های اطراف ساقه برداشته شدند تا زمانی که برگ‌های اولیه در معرض دید قرار گرفتند و از پایه جدا گشتند. در نهایت مریستم به صورت طولی به چند قطعه برش داده شد.

القای کالوس: بعد از مرحله‌ی ضدعفونی و جدا کردن برگ‌های اولیه، جهت القای کالوس، از محیط MS[3] حاوی ۱۰ میلی‌گرم در لیتر 2,4,D[4]، ۳ میلی‌گرم در لیتر 2ip[3]، ۲ گرم در لیتر زغال فعال، ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر گلوتامین، ۵ میلی‌گرم در لیتر تیامین، ۱ میلی‌گرم در لیتر بیوتین و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز استفاده شد. محیط با ۷ گرم در لیتر آگار جامد تکمیل گشت و قبل از اتوکلاو به مدت ۲۰ دقیقه pH محیط بین ۵/۷-۵/۸ تنظیم گشت. کشت‌ها در تاریکی در دمای ۲±۲۷ درجه سانتیگراد نگهداری شدند و هر ۶ هفته یکبار به مدت ۱۸ ماه در شرایط کشت یکسان واکشت گردیدند.

تکثیر کالوس: پس از دوره القای (۱۸ ماه) ریز نمونه‌هایی که مرحله القای کالوس را سپری کردند جهت تکثیر انتخاب گردیدند و جهت بررسی اثر غلظت‌های مختلف هورمونی از NAA و 2ip تعداد ۲۰ پتری از ریزنمونه‌هایی که مرحله القای کالوس را انجام داده‌اند به محیط کشت MS به شرح جدول ۱، شامل ۳۰ میلی‌گرم در لیتر ساکارز، ۱ میلی‌گرم در لیتر تیامین و ۱ میلی‌گرم

[1] Murashige and Skoog
[2] 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
[3] 2-isopentenyl adenine

در لیتر بیوتین اضـافه شـدند و به منظور جذب فنول مقدار ۳ میلی‌گرم در لیتر ذغال اضـافه گشـت و بعد از گرفتن pH به تمام محیط‌ها ۷ میلی‌گرم در لیتر آگار افزوده گردید. این آزمایش به صـورت طرح کاملاً تصـادفی با ۵ تکرار (هر تکرار شـامل ۳ پتری) انجام گشت و کالوس‌ها برای ۱۲ هفته در محیط‌ها نگهداری شدند و در بازه‌ی زمانی ۳ هفته‌ای واکشت (۴ واکشت) گردیدند و در پایان هر ۳ هفته مورد ارزیابی قرار گرفتند. ریز نمونه‌ها در فیتوترون و در شـرایط روشـنایی و دمای ۳±۲۴ درجه‌ی سـانتی‌گراد نگهداری شدند و جهت تعیین بهترین تیمار کالوس‌زایی، ارزیابی وزن کالوس‌های حاصل محاسبه گشت.

اندازه‌گیری وزن کالوس‌ها: جهت ارزیابی وزن کالوس‌های حاصل در مرحله اول پس از ریخته شدن محیط در پتری‌ها و سفت شدن محیط، هر پتری در زیر هود لامینار وزن شد. پس از انتقال کالوس‌ها، مجددا پتری‌ها وزن گردیدند. وزن دو مرحله از هم کم شد و وزن کالوس اولیه در هر پتری بدست آمد. در پایان هر ۳ هفته پتری‌ها مجددا وزن گردیدند و وزن حاصل ابتدا از وزن مرحله اول کم گشت و وزن کالوس بدست آمد. سپس وزن کالوس بدست آمده از وزن کالوس اولیه کم گردید و میزان تکثیر در هر پتری مشخص گشت. در آزمایش دوم کالوس‌های تشکیل شده از ریز نمونه‌های مریستمی خرما در محیط کشت MS به چهار محیط کشت با تیمارهای مختلف هورمونی از NAA و BAP[5] به محیط کشت MS به شرح جدول ۲، منتقل شدند.

جدول ۱. نوع و مقادیر ترکیب تنظیم کننده رشدی جهت تکثیر کالوس خرمای مجول

Table 1. Type and amount of hormonal composition for Propagation of callus of Medjool dates

شماره تیمار **Treatment number**	نوع تنظیم‌کننده‌های رشد **Type of growth regulators**	غلظت‌ها (میلی‌گرم بر لیتر) **Concentrations (mg/L)**
1	2ip+NAA	10+30
2	2ip+NAA	10+20
3	2ip+NAA	10+10
4	2ip+NAA	0.1+0.05

هر تیمار شـامل ۳۰ میلی‌گرم در لیتر سـاکارز، ۵ میلی‌گرم در لیتر تیامین و ۱ میلی‌گرم در لیتر بیوتین بود و به منظور جذب فنول مقدار ۳ گرم در لیتر زغال فعال جهت تعیین بهترین تیمار کالوس‌زایی اسـتفاده شـد. بعد از گرفتن pH به تمام محیط‌ها ۷ میلی‌گرم در لیتر آگار افزوده گردید. این آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی با ۵ تکرار (هر تکرار شامل ۳ پتری) انجام گردید. کالوس‌ها برای ۱۲ هفته در محیط نگهداری شـدند. واکشـت نمونه‌ها در بازه‌ی زمانی ۳ هفته‌ای (۴ واکشـت) بوده و در پایان هر ۳

[1] 6-Benzylaminopurine,

هفته مورد ارزیابی قرار گرفتند. ریز نمونه‌ها در فیتوترون و در شرایط روشنایی و دمای ۳±۲۴ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند و جهت ارزیابی کالوس‌های حاصل، وزن آن‌ها به روش ذکر شده محاسبه گردید.

جدول ۲. نوع و مقادیر ترکیب تنظیم کننده رشدی جهت تولید کالوس خرمای مجول

Table 2. Type and amount of hormonal composition to produce the callus of Medjool dates

شماره تیمار Treatment number	نوع تنظیم‌کننده‌های رشد Type of growth regulators	غلظت‌ها (میلی‌گرم بر لیتر) Concentrations (mg/L)
1	BAP+NAA	10+30
2	BAP+ NAA	10+20
3	BAP+ NAA	10+10
4	BAP+ NAA	0.1+0.05

در آزمایش سوم پس از تعیین بهترین تیمارهای هورمونی از آزمایش اول و دوم، مجددا کالوس‌های تشکیل‌شده از ریز نمونه‌های مریستمی خرما به تیمارهای برتر آزمایش اول و دوم به همراه غلظت‌های مختلف نانوذرات ۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ میلی‌گرم در لیتر ا ضافه گردیدند (جدول ۳) و برای ۱۲ هفته در این محیط‌ها نگهداری شدند و در بازه‌ی زمانی ۳ هفته‌ای واک شت (۴ واک شت) شدند و در پایان هر ۳ هفته مورد ارزیابی قرار گرفتند. ریز نمونه‌ها در فیتوترون و در شرایط رو شنایی و دمای ۳±۲۴ درجه‌ی سانتی گراد نگهداری شدند و جهت ارزیابی کالوس‌های حاصل، وزن آن‌ها محاسبه گردید. این آزمایشات به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تکرار (هر تکرار شامل ۳ پتری) انجام شد و وزن تازه کالوس‌ها به روش ذکر شده اندازه‌گیری گشت.

سنتز نانوافزودنی کربنی: برای سنتز نانوذرات، ابتدا ۲ گرم پیش ماده کربنی غیرنانویی (شرکت سیگما) و ۵۰ میلی‌لیتر سولفوریک اسید غلیظ همزده شد. سپس نیترات سدیم به آن اضافه گشت و پس از یک ساعت هم زدن در حمام آب–یخ، دمای آن را به صفر درجه سانتیگراد رساندیم. سپس ۷/۳ گرم پرمنگنات پتاسیم ($KMnO_4$) به تدریج اضافه شد و دمای مخلوط واکنش تا ۳۵ درجه سانتیگراد افزایش داده شد و به مدت ۲ ساعت در این دما مخلوط گردید. در ادامه ۴۶ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر به ظرف واکنش افزوده و سپس در دمای ۹۰ درجه سانتیگراد و به مدت ۳۰ دقیقه همزده شد. واکنش با ا ضافه کردن ۱۴۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر و ۱۶ میلی‌لیتر آب اکسیژنه ۳۰٪، متوقف گردید. برای تولید نانوذرات، سوسپانسیون حاصل در دستگاه التراسونیک در ۳۵ KHz به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. سپس CNP تولید شده با محلول 3%HCl ، ۳–۴ بار شستشو داده شد و با کمک قیف بوخنر صاف گردید. در مرحله بعد سوسپانسیون حاصل ۴–۳ بار با آب دو بار تقطیر شستشو داده شد. سوسپانسیون به دست آمده پس از هر بار شستشو، با روش فیلترا سیون صاف شد. ماده جامد حا صل در آون خلأ با دمای ۴۰ درجه سانتیگراد خ شک

گردید(Hummers et al. 1958). نانوافزودنی کربنی حاصل توسط میکروسکوپ نیروی اتمی (مدل دستگاه AFM: DualScope RasterScope C26 controller, DS 95-50 scanner. کمپانی: DME کشور سازنده: دانمارک. شعاع نوک سوزن: کمتر از ۱۰ نانومتر و ثابت فنر ۴۲ نیوتن بر متر)، و روش‌های پراکندگی نور دینامیکی (مدل دستگاه DLS: Stabisizer 200 نام کمپانی: particlemetrix. کشور سازنده: آلمان) اندازه‌گیری شد.

جدول ۳. مشخصات تیمارهای غلظت‌های مختلف نانوذرات کربنی و تنظیم کننده‌های رشد بر تولید کالوس‌های خرما

Table 3. Characteristics of treatments of different concentrations of carbon nanoparticle (CNP) and growth regulators on the production of date calli

غلظت‌ها (میلی‌گرم بر لیتر) Concentrations (mg/L)	نوع تنظیم‌کننده‌های رشد Type of growth regulators	شماره تیمار Treatment number
10+30+0	BAP+CNP+NAA	1
10+30+15	BAP+CNP+NAA	2
10+30+30	BAP+CNP+NAA	3
10+30+45	BAP+CNP+NAA	4
10+30+50	BAP+CNP+NAA	5
10+10+0	BAP+CNP+NAA	6
10+10+15	BAP+CNP+NAA	7
10+10+30	BAP+CNP+NAA	8
10+10+45	BAP+CNP+NAA	9
10+10+50	BAP+CNP+NAA	10
10+30+0	2ip+CNP+NAA	11
10+30+15	2ip+CNP+NAA	12
10+30+30	2ip+CNP+NAA	13
10+30+45	2ip+CNP+NAA	14
10+30+50	2ip+CNP+NAA	15
0.1+0.05+0	2ip+CNP+NAA	16
0.1+0.05+15	2ip+CNP+NAA	17
0.1+0.05+30	2ip+CNP+NAA	18
0.1+0.05+45	2ip+CNP+NAA	19
0.1+0.05+50	2ip+CNP+NAA	20

در روش تصویربرداری به کمک میکرو سکوپ نیروی اتمی، یک نمونه بسیار رقیق از نانو ذره سنتز شده تهیه شد و پس از سونیکیت، یک قطره از آن را روی سطح میکا قرار داده شد و بعد از خشک شدن حلال، صفحات گرافن اکسایدی که روی میکا باقی می‌ماند روی استیج دستگاه قرار گرفت و در حالت کاری غیر تماسی تصویربرداری انجام شد. برای اندازه‌گیری در روش پراکندگی نور دینامیکی، در یک بشر، نمونه غلیظ از نانو سنتز شده تهیه شده و در دستگاه قرار داده شد. پروب دستگاه را نزدیک نمونه کرده و دستگاه با استفاده از نور لیزر و توری مای نور را به ذرات که در فاز مایع و در حال حرکتند می تاباند. ذرات، نور را پراکنده می‌کنند این پراکندگی نور توسط دستگاه ارزیابی می‌شود. سپس برای اندازه گیری، سایز ذرات با مدل های تئوری مقایسه گردید و در نهایت داده‌های بدست آمده به اندازه ذره و تابع توزیع ذرات نسبت داده شد.

آنالیزهای آماری: آنالیز آماری نتایج با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 تجزیه واریانس گردید. مقایسه میانگین‌ها نیز بر اساس آزمون LSD انجام شد. رسم نمودارها به وسیله نرم‌افزار Microsoft Office Excel 2010 صورت گرفت.

نتایج و بحث

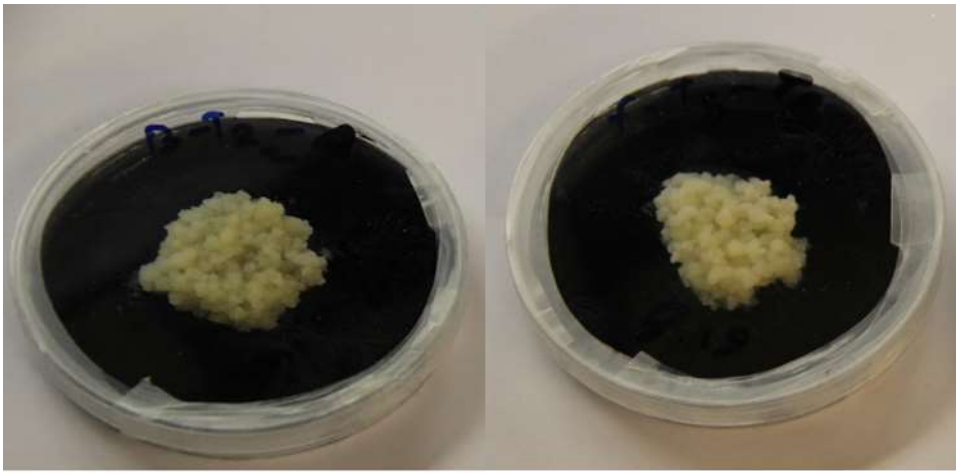
تکثیر کالوس‌های معمولی خرمای مجول: در مطالعه حاضر به منظور القای کالوس‌های اولیه از مریستم پاجوش خرمای مجول استفاده گردید لذا پس از ضد عفونی قسمت‌های حاوی مریستم، ریزنمونه‌ها جهت تولید کالوس به محیط حاوی 2,4,D و 2ip منتقل شدند (شکل ۱).

شکل ۱. تصویر سمت راست استخراج قطعه‌ی حاوی مریستم پاجوش و کشت آن در محیط حاوی ۱۰ میلی‌گرم در لیتر2,4,D و ۳ میلی‌گرم در لیتر 2ip، تصویر سمت چپ القای کالوس از مریستم پاجوش خرمای رقم مجول

Figure 1. Image on the right Extracting a piece containing Meristem offshoot and culturing it in medium containing 10 mg/L 2,4, D and 3 mg/L 2ip, Left image Induction of calli from Meristem offshoot Dates of Modjul cultivar

در بررســی‌های اولیه بر روی تکثیر کالوس خرما ابتدا چهار تیمار حاوی تنظیم‌کننده رشــد NAA و 2ip مورد ارزیابی قرار گرفت (آزمایش اول). نتایج تجزیه واریانس نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد میان تیمارهای اعمال شده جهت تولید کالوس است (جدول۴). کالوس‌های حاصل از اعمال بهترین تیمارها (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر 2ip و تیمار۱۰ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۳۰ میلی‌گرم در لیتر 2ip) در شکل ۲، نشان داده شده است.

مقایسه میانگین‌ها مشخص نمود نتیجه حاصل از تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر 2ip با تولید کالوس‌هایی با میانگین وزنی ۳۱۸ میلی‌گرم و تیمار۱۰ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۳۰ میلی‌گرم در لیتر 2ip با تولید کالوس‌هایی با وزن ۲۹۴ میلی‌گرم از نظر آماری تفاوت معنی‌داری وجود نداشــت و از نظر تولید کالوس اثر یکســانی دارند و در عین حال موفق به تولید کالوس هایی با بیشترین وزن در مقایسه با دیگر تیمارها شدند (شکل ۳). سایر تیمارها از جمله ، ۱۰میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه ۲۰ میلی‌گرم در لیتر 2ip با تولید کالوس‌هایی با وزن ۱۶۸ میلی‌گرم از نظر آماری در مقایســه با دیگرتیمارها تفاوت معنی داری وجود داشــت و کالوس‌هایی با کمترین وزن را تولید کردند. تیمار ۱۰ میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه ۱۰ میلی‌گرم در لیتر 2ip با تولید کالوس‌هایی با وزن ۲۳۲ میلی‌گرم نیز تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارها نشان داد.



شکل ۲. شکل سمت راست کالوس‌های حاصل از تیمار۱۰ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۳۰ میلی‌گرم در لیتر 2ip و شکل سمت چپ کالوس‌های حاصل از تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر 2ip

Figure 2. Right figure of calli from 10 mg/L NAA + 30 mg/L 2ip and left figure of calli from 0.1 mg/L NAA + 0.05 mg/L 2ip

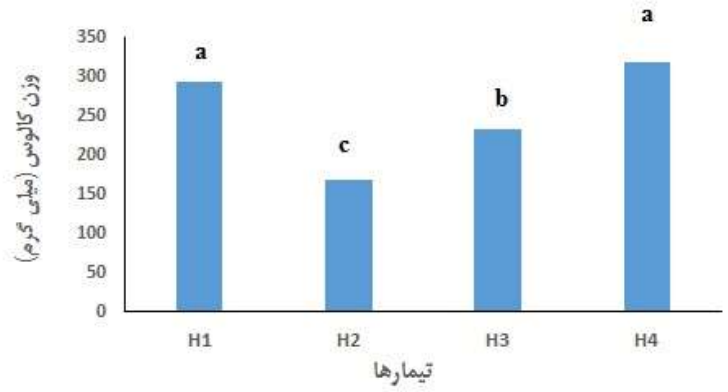
جدول ٤. تجزیه واریانس تنظیم‌کننده‌های مختلف بر وزن کالوس خرما در آزمایش اول

Table 4. Analysis of variance of different regulators on the weight of date callus in the first experimen

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean Squares
تیمار Treatment	3	22620**
خطا Error	16	1747.5
ضریب تغییرات (٪) C.V	-	16.52

** نشان‌دهنده معنی‌داری آماری در سطح ۱ می‌باشد.

**= indicated significance at P < 0.01 level



شکل ۳. اثر تیمارهای مختلف تنظیم‌کننده رشد بر وزن کالوس خرما. H1: ۱۰میلی‌گرم NAA + ۳۰ میلی‌گرم در لیتر2ip؛ H2:۱۰میلی‌گرم NAA + ۲۰ میلی‌گرم در لیتر2ip؛ H3:۱۰میلی‌گرم NAA + ۱۰ میلی‌گرم در لیتر2ip؛ H4: ۰/۱ میلی‌گرم NAA + ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر2ip

Figure 3. Effect of different growth regulating treatments on the weight of date calli. H1: 10 mg NAA + 30 mg 2 l 2 ip; H2: 10 mg NAA + 20 mg per liter 2 ip; H3: 10 mg NAA + 10 mg per liter 2 ip; H4: 0.1 mg NAA + 0.05 mg/L 2ip

در این آزمایش غلظت پایین 2ip تاثیر بهتری نسبت به سایر غلظت‌ها بر وزن کالوس‌های خرما تولید شده داشت که با نتایج Habashi et al (2008) مطابقت دارد. همچنین در کشت بافت خرما درصد بهینه تشکیل کالوس و اندازه کالوس بر روی محیط کشت MS حاوی پیکلورام با غلظت ۸ میلی گرم در لیتر به دست آمد و بیشترین وزن و اندازه کالوس با NAA در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر، 2ip با غلظت ۶ میلی‌گرم در لیتر و Kin با غلظت ۶ میلی‌گرم در لیتر در طول تکثیر کالوس نشان داده شد

(Rohim et al. 2020). به طور کلی تنظیم‌کننده‌های مختلف و غلظت آن‌ها اثرات مختلفی بر خرما دارند، به ویژه اینکه ارقام مختلف خرما نیز عکس العمل‌های متفاوتی به تنظیم‌کننده‌های مختلف نشان می‌دهند. Mazri et al (2017) نیز گزارش نمودند کاربرد هورمون 2ip اثر مثبتی بر تولید کالوس در محیط MS داشـت. Sané et al (2012) نیز اثر مثبت 2ip و BAP به ویژه در ترکیب با 2-4-D بر القای و توسعه کالوس را در خرما گزارش نمودند.

تکثیر کالوس‌های معمولی خرمای مجول: در آزمایش دوم بر روی تکثیر کالوس خرما، چهار تیمار تنظیم‌کنندهای مختلف ر شد مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج تجزیه واریانس ن شان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار، میان تیمارهای اعمال شده جهت تولید کالوس است (جدول۵).

جدول ۵. تجزیه واریانس تنظیم‌کننده‌های مختلف بر وزن کالوس خرما در آزمایش دوم

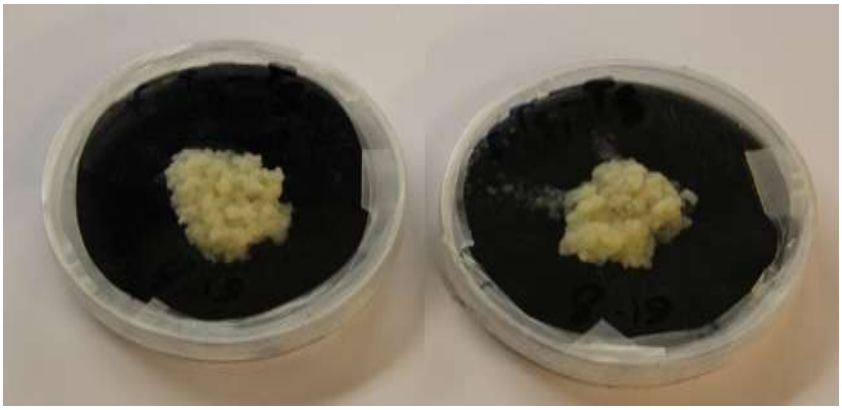
Table 5. Analysis of variance of different regulators on the weight of date callus in the secend experiment

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی Df	میانگین مربعات Mean Squares
تیمار Treatment	3	11263.94^{ns}
خطا Error	12	63915.3940
ضریب تغییرات (٪) C.V	-	14.19

ns نشان‌دهنده عدم معنی‌داری می‌باشند ns= indicated nonsignificance

مقایســـه میانگین‌ها مشـــخص نمود که میان تیمارهای ۱۰ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۳۰ میلی‌گرم در لیتر BAP با تولید کالوس هایی با م یانگین وزنی۱۸۳۵/۳ میلی‌گرم و تی مار ۱۰ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۱۰ میلی‌گرم در لیتر BAP با تولید کالوس‌هایی با وزن ۱۸۱۰/۸ میلی‌گرم، تیمار ۱۰ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۲۰ میلی‌گرم در لیتر BAP با تولید کالوس‌هایی با وزن ۱۷۶۰/۴ میلی‌گرم و تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر BAP با تولید کالوس‌هایی با وزن ۱۷۱۶/۳ میلی‌گرم اختلاف معنی‌داری وجود نداشـت و به عبارتی از نظر تولید کالوس اثر یکسـانی دارند. در عین حال تیمار ۱۰ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۳۰ میلی‌گرم در لیتر BAP و تی مار ۱۰ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۱۰میلی‌گرم در لیتر BAP موفق به تولید کالوس‌هایی با بیشترین وزن در مقایسه با دیگر تیمارها شدند (شکل ۴). در پژوهشی Abo et al (1989) دریافتند که NAA، IAN و 2,4,D فعال ترین ترکیبات در محیط کشت خرما می‌باشند و پیشنهاد کرد که ترکیبات NAA می‌توانند جایگزین مناسبی برای 2,4-D در ک شت بافت خرما با شند. همچنین در برر سی‌های این بخش و مرحله قبلی م شاهده شد که وزن تر کالوس‌ها با افزایش غلظت هورمون NAA در ترکیبات محیط افزایش می یابد این نتیجه با نتایج بدســـت آمده توســـط et al (2007)

Asemota که از NAA در سطح بهینه ۱۵ میلی‌گرم در لیتر استفاده کرده بودند، مطابقت داشت. در مطالعه‌ی (2012) Goleyjani et al نیز نشان داده شد که هورمون BAP موجب افزایش میزان باززایی ارقام مختلف کلزا شد.

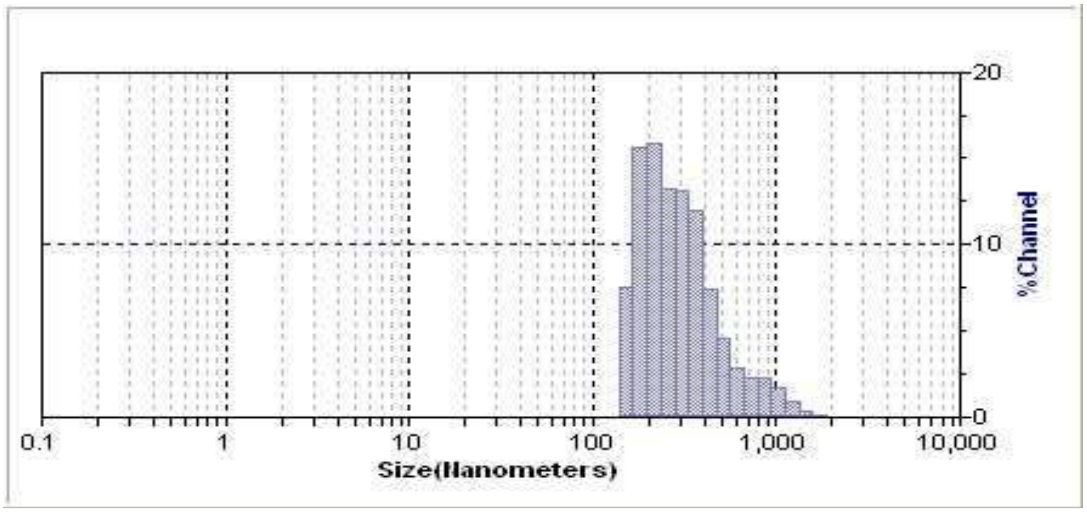


شکل ٤. شکل سمت راست کالوس‌های حاصل از اعمال تیمار ۱۰ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۳۰ میلی‌گرم در لیترBAP و شکل سمت چپ کالوس‌های حاصل از تیمار ۱۰ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۱۰ میلی‌گرم در لیتر BAP

Figure 4. Right figure of calli resulting from 10 mg/L NAA + 30 mg/L BAP treatment and left figure of calli from 10 mg/L NAA + 10 mg/L BAP

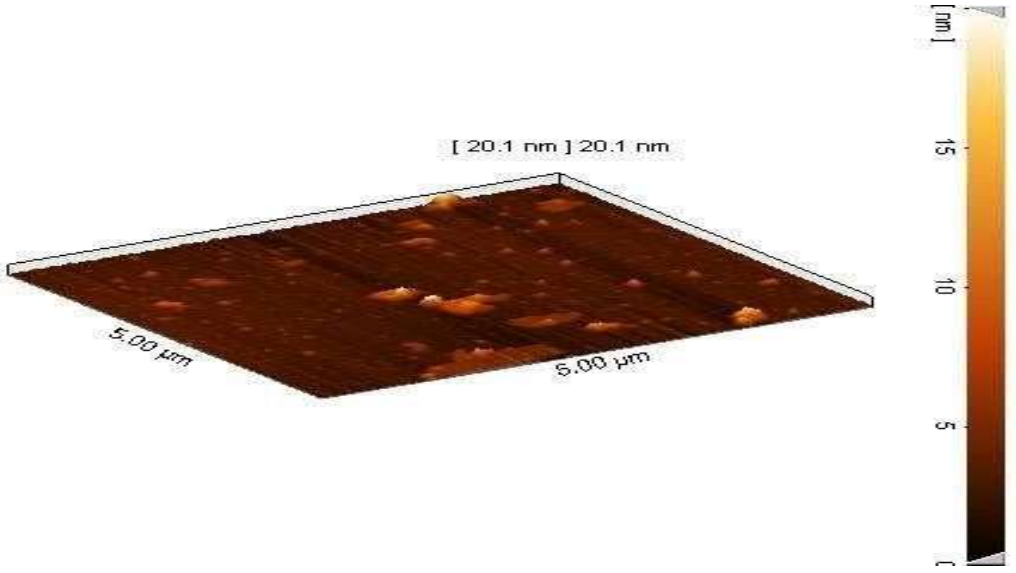
اندازه‌گیری با روش پراکندگی نور دینامیکی: پراکندگی نور دینامیکی روشی فیزیکی است که برای تعیین توزیع ذرات موجود در سوسپانسیون‌ها استفاده می‌شود. این روش غیرمخرب و سریع برای تعیین اندازه ذرات در محدوده چند نانومتری تا میکرون به کار می‌رود. اساس این روش را برهمکنش نور با ذره تشکیل می‌دهد. نور پراکنده شده بوسیله نانوذرات موجود در سوسپانسیون در طی زمان تغییر می‌کند که می‌توان آن را به قطر ذره مرتبط نمود. در این روش اندازه ذره به صورت سایز هیدرودینامیک بدست می‌آید که بیانگر قطر آب پوشاننده نانوذرات است. در این مطالعه سایز هیدرودینامیکی نانو ذرات کربنی سنتز شده مورد استفاده به طورمیانگین ۳۴۹ نانومتر ارزیابی شد. فراوانی و توزیع اندازه نانو ذرات در شکل ۵، نشان داده شده است.

نتایج میکروسکوپ AFM: میکروسکوپ AFM این امکان را فراهم می‌نماید تا ساختار سطح را با وضوح مشاهده و اندازه‌گیری نماییم. تصویر سه بعدی توپوگرافی نانوذرات کربنی در شکل ۶، نمایش داده شده است. در تصویر توپوگرافی رنگ‌ها بصورت مجازی تعریف می‌شوند، بطوریکه رنگ‌های روشن برجستگی و رنگ‌های تیره فرورفتگی‌های سطح نمونه را نشان می‌دهند. نتایج آنالیز AFM میانگین اندازه نانوذرات کربنی را ۵±۲۰ نانومتر نشان داد.



شکل ٥. نمودار میزان پراکندگی اندازه نانو ذرات کربنی با روش DLS

Figure 5. Scatter diagram of carbon nanoparticles size by DLS method



شکل ٦. تصویر سه بعدی نانوذرات کربنی اکساید توسط میکروسکوپ AFM

Figure 6. 3D image of oxide carbon nanoparticles by AFM microscope

تاثیرات نانو ذرات کربنی و تنظیم کننده‌های مختلف رشد بر روی تکثیر کالوس‌های معمولی: نتایج حاصل از آزمایش سوم در ارتباط با اثرات دوگانه هورمون × غلظت نانوذرات کربنی (CNP) بر وزن کالوس‌های تولید شده در جدول ۶، نشان داده شده است. بیشترین وزن کالوس به میزان ۲۱۸۸/۹ میلی‌گرم، در تیمار ۱۰ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۳۰ میلی‌گرم در لیتر BAP در غلظت ۳۰ میلی گرم بر لیتر CNP به دست آمد که در غلظت‌های ۴۵ و ۵۰ میلی گرم بر لیتر CNP و با تیمار ۱۰ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۱۰ میلی‌گرم در لیتر BAP در غلظت‌های ۰، ۳۰، ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر CNP، تیمار ۱۰ میلی‌گرم در

لیتر NAA + ۳۰ میلی‌گرم در لیتر 2ip در غلظت ۱۵ ،۴۵، ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر CNP و همچنین با تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر 2ip در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر CNP اختلاف معنی داری را نشان نداد (شکل ۷). همچنین تیمار شاهد ۱۰ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۳۰ میلی‌گرم در لیتر 2ip با کمترین وزن کالوس ۳۰۳/۳ با تیمار شاهد ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر 2ip دارای عدم اختلاف معنی‌داری بود. در شکل ۸، کالوس‌های حاصل از اثرات دوگانه هورمون × غلظت‌های (CNP) در تیمارهای منتخب آزمایش اول و دوم نشان داده شده است.

مطالعات انجام گرفته حاکی از افزایش وزن‌تر کالوس خرما تحت تیمار با نانولوله‌های کربنی بود (Taha et al. 2016). همچنین گرافن به عنوان یک ماده کربنی در غلظت کم، جوانه زنی بذر گوجه‌فرنگی و رشد گیاهچه را تحت تأثیر قرار داد (Zhang et al. 2015). نتایج Kavianifar et al (2018) بر روی گیاه کتان حاکی از تأثیر مثبت دوز پایین نانو الیسیتورها بر القای کالوس و تولید موسیلاژ بود. علاوه بر این، نتایج آن‌ها نشان داد که القای کالوس شدیداً وابسته به حضور اکسین و سیتوکینین است که تقسیم سلولی و افزایش طولی سلول را تحریک می کند. نتایج کشت بافت برگی گیاه *Satureja khuzestanica* نشان داد که حضور نانوتیوب‌های چند جداره کربن در محیط کشت B5 و در غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر منجر به بیشترین میزان رشد کالوس شد ولی غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر حداکثر تولید مواد فنولی، فلاوونوئیدی و کافئیک اسید را در پی داشت (Ghorbanpour and Hadian 2015).

گزارشات حاکی از این است که CNTهای چند جداره به عنوان تنظیم کننده برای جوانه زنی و رشد بذر عمل می کنند (Khodakovskaya. 2012). این CNTها می‌توانند رشد کشت سلولی تنباکو را با سازماندهی ژن‌های نشانگر برای تقسیم سلولی، تشکیل دیواره سلولی و انتقال آب افزایش دهند. پیش از این، در سال ۲۰۰۹، آن‌ها دریافتند که CNTها می‌توانند به لایه دانه‌های گوجه فرنگی نفوذ کنند و باعث جوانه زنی و رشد شوند. مطالعات Flores (2014) بیانگر این بود که نانوتیوب‌های کربن، رشد درون شیشه‌ای و ریشه‌زایی تمشک سیاه را افزایش می‌دهند. از سویی Javed et al (2017) نشان دادند که بیشترین میزان شاخه‌زایی (۸۹.۶ درصد) در استویا در حضور ۱ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات اکسیدزینک مشاهده می‌شود. تیمار دانه‌های گوجه فرنگی با نانوذرات، آلودگی باکتریایی را حذف و پتاسیل ریخت‌زایی جداکشت را افزایش می‌دهد (Khodakovskaya et al. 2013). در مطالعه‌ای Helaly et al (2014) گزارش کرده‌اند که در گیاه موز حداکثر جنین‌زایی در محیط MS حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات روی رخ داد و طول ساقه و ریشه نیز پس از افزودن این ذرات به محیط MS افزایش یافت.

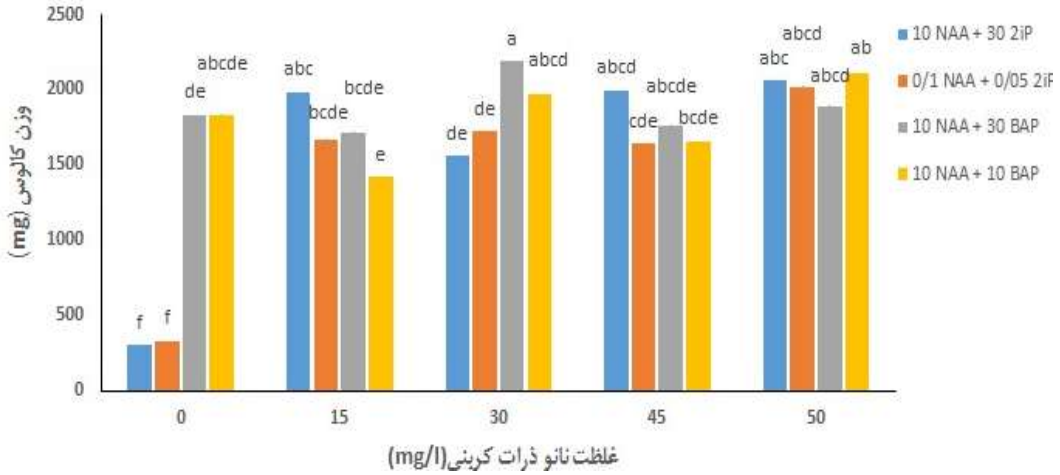
جدول ٦. تجزیه واریانس تیمارهای مختلف هورمونی و غلظت‌های مختلف نانوذرات (CNP) بر وزن کالوس خرما

Table 6. Analysis of variance of growth regulators treatments and different concentrations of CNP on callus weight

Mean Squares میانگین مربعات	Df درجه آزادی	S.O.V منابع تغییرات
582726.4**	3	محیط کشت هورمونی growth regulators culture
1517430.7 **	4	GNP different concentrations of CNP
576012.22**	12	× محیط کشت هورمونی NP growth regulators culture× CNP
16.47	-	C.V ضریب تغییرات

** نشان‌دهنده معنی‌داری آماری در سطح ١ می‌باشد.

**= indicated significance at P < 0.001 level



شکل٧. اثر تیمارهای مختلف تنظیم‌کننده رشد و غلظت‌های مختلف نانو ذرات کربنی (CNP)

Figure 7. Effect of different regulatory treatments and Different concentrations of CNP

شکل ۸. کالوس‌های حاصل از اثرات دوگانه هورمون × غلظت (CNP) در تیمار تیمار۱۰ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۳۰ میلی‌گرم در لیتر BAP در غلظت ۳۰ میلی گرم بر لیترCNP

Figure 8. Calli resulting from dual effects of hormone × concentration (CNP) in the treatment of 10 mg/L NAA + 30 mg/L BAP at a concentration of 30 mg/L CNP

نتیجه‌گیری: در این مطالعه آزمایش‌های مختلفی برای بررســی اثر نانوذرات کربنی همراه با ســایر عوامل اثر گذار مانند تنظیم‌کننده‌های رشــد گیاهی و نســبت محیط کشــت بر تکثیر کالوس خرما رقم مجول انجام شــد. در ارزیابی اول ، ۴ تیمار۱۰ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۳۰ میلی‌گرم در لیتر 2ip و تیمار ۱۰میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه ۲۰ میلی‌گرم در لیتر 2ip و تیمار ۱۰ میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه ۱۰ میلی‌گرم در لیتر 2ip و تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر 2ip جهت رشد و تکثیر کالوس‌های خرما مورد بررسی قرار گرفتند که از میان آنها تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر 2ip و تیمار۱۰ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۳۰ میلی‌گرم در لیتر 2ip برای ادامه مطالعه انتخاب شــدند. در ارزیابی دوم در بررسی اثر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده رشد BAP بر روی تولید و تکثیر کالوس، مقایسه میانگین‌ها مشخص نمود که میان تیمارهای ۱۰ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۳۰ میلی‌گرم در لیتر BAP و تیمار ۱۰ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۲۰ میلی‌گرم در لیتر BAP و تیمار ۱۰ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۱۰ میلی‌گرم در لیتر BAP و تیمارهای ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر BAP از نظر آماری تفاوت معنی داری وجود نداشت و از نظر تولید کالوس اثر یکسانی دارند و در عین حال تیمار ۱۰ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۳۰ میلی‌گرم در لیتر BAP و تیمار ۱۰ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۱۰ میلی‌گرم در لیتر BAP موفق به تولید کالوس‌هایی با بیشترین وزن در مقایسه با دیگر تیمارها شدند و برای ادامه‌ی مطالعه انتخاب گردیدند.

در ارزیابی ســوم در بررســی اثرات دوگانه هورمون × غلظت نانو ذره کربنی، پس از اعمال غلظت‌های ۰، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات کربنی (CNP) به تیمارهای برتر از دو آزمایش قبلی مشخص شد که بیشترین وزن کالوس در تیمار۱۰

میلی‌گرم در لیتر NAA + ۳۰ میلی‌گرم در لیتر BAP در غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر CNP به دســت آمد که در غلظت‌های ۱۵، ۴۵، ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر CNP و با تیمار ۱۰ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۱۰ میلی‌گرم در لیتر BAP در غلظت‌های ۰، ۳۰، ۴۵، ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر CNP، تیمار ۱۰ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۳۰ میلی‌گرم در لیتر 2ip در غلظت ۱۵، ۴۵، ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر CNP و همچنین با تیمار۱۰ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر 2ip در غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر CNP اختلاف معنی داری بد ست نیامد. همچنین تیمار شاهد ۱۰ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۳۰ میلی‌گرم در لیتر 2ip با کمترین وزن کالوس با تیمار شاهد ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر 2ip دارای عدم اختلاف معنی‌داری بودند. با توجه به تاثیر مثبت نانو ذرات کربنی در افزایش میزان تکثیر کالوس، می توان اســتفاده از نانوذرات کربنی را در غلظت مناســب چهت افزایش کالوس‌زایی در خرما، پیشــنهاد کرد. با توجه به اثرات مثبت و منفی اعمال نانو ذرات، کماکان بررســی و تحقیق بر روی روش مکانیسم عمل نانوذرات مورد نیاز است.

سپا سگزاری: از معاونت محترم پژوهشــکده بیوتکنولوژی کشــاورزی (ABRII)، ســازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، به خاطر حمایت مالی/ حمایت معنوی / همکاری در اجرای پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود.

منابع

حب شی علی‌اکبر، مو سوی امیر، کاویانی مینا، خو شکام صغری و ر ستمی علی‌مردان (۱۳۸۷) ریزازدیادی خرما از طریق جنین‌زایی رویشی. علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی ۱۲، ۷-۱.

References

Abahmane L (2017) Cultivar-dependent direct organogenesis of date palm from shoot tip explants. Methods Mol Biol 1637, 3-15.

Al-Khayri JM, Jain S, Johnson D (2017) Date palm biotechnology protocols (1st edn), Volume I. Tissue culture applications. Springer, New York 3–15.

Al-Khayri JM (2010) Somatic embryogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) improved by coconut water. Biotechnol J 9, 477-484.

Al-Khayri JM (2011) Basal salt requirements differ according to culture stage and cultivar in date palm somatic embryogenesis. Am J Biochem Biotechnol 7, 32-42.

Alvarez SP, Tapia MA, Vega ME et al. (2019) Nanotechnology and Plant Tissue Culture. In Plant Nanobionics pp.333-370.

Asemota O, Eke CR, Odewale JO (2007) Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) in vitro morphogenesis in response to growth regulators, sucrose and nitrogen. Afr J Biotech 6, 2353-2357.

Chhipa H (2017a) Nanofertilizers and nanopesticides for agriculture. Environ 15, 15–22

Chhipa H (2017b) Nanopesticide: current status and future possibilities. Agri Res Technol J 5, 1-4

Chhipa H, Joshi P (2016) Nanofertilisers, nanopesticides and nanosensors in agriculture. In: Nanoscience in Food and Agriculture 1. Springer 247–282.

Duhan JS, Kumar R, Kumar N et al. (2017) Nanotechnology: the new perspective in precision agriculture. Biotech Rep 15, 11–23.

Fazal H, Abbasi BH, Ahmad N, Ali M (2016) Elicitation of Medicinally Important Antioxidant Secondary Metabolites with Silver and Gold Nanoparticles in Callus Cultures of *Prunella vulgaris* L. Appl Biochem Biotech 180, 1076–1092.

Flores D, Chacón R, Alvarado L et al. (2014) Effect of using two different types of carbon nanotubes for blackberry (*Rubus adenotrichos*) in vitro plant rooting, growth and histology. Am J Plant Sci 5, 3510.

Fraceto LF, Grillo R, Medeiros GA et al. (2016) Nanotechnology in agriculture: which innovation potential does it have? Front. Environ Sci 4- 20.

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.

Goleyjani MR, Motallebi M, Zamani MR, Rezanejad H (2012) Optimization of regeneration and transformation of canola Hyola 308 and RGS003 lines. Iran J Plant Biol 4, 47-60.

Habashi A, Mousavi A, Kaviani M, Khoshkam S, Rostami A (200۸) Micropropagation of Date Palm via Somatic Embryogenesis. J Child Psychol Psychiatry 12, 1-7

Heidarpour F, Mohammadabadi MR, Zaidul ISM et al. (2011) Use of prebiotics in oral delivery of bioactive compounds: a nanotechnology perspective. Pharmazie 66 (5), 319-324.

Helaly MN, El-Metwally MA, El-Hoseiny H et al. (2014) Effect of nanoparticles on biological contamination of in vitro cultures and organogenic regeneration of banana. Aust J Crop Sci 8, 612-624.

Hummers JR, William S, Richard E (1958) Offeman. "Preparation of graphitic oxide. J Am Chem Soc 80.6: 1339-1339.

Javed R, Mohamed A, Yücesan B et al. (2017) CuO nanoparticles significantly influence in vitro culture, steviol glycosides, and antioxidant activities of Stevia rebaudiana Bertoni. Plant Cell Tiss Organ Cul 131, 611-620.

Kavianifar S, Ghodrati K, Naghdi H, Etminan A (2018) Effects of Nano Elicitors on Callus Induction and Mucilage Production in Tissue Culture of *Linum usitatissimum* L. J Med Plant Res 17, 45-54.

Khadri H, Alzohairy M, Janardhan A et al. (2013) Green synthesis of silver nanoparticles with high fungicidal activity from olive seed extract. Nanopartic 2(3):241-246.

Khierallah HS, Bader SM, Al-Khafaji MA (2017) NAA-induced direct organogenesis from female immature inflorescence explants of date palm. Date Palm Biotechnology Protocols Volume 1. 1637, 17-25.

Khodakovskaya MV, De Silva K, Biris AS et al. (2012) Carbon nanotubes induce growth enhancement of tobacco cells. ACS Nano 6, 2128–2135.

Khodakovskaya MV, Kim BS, Kim JN et al. (2013) Carbon nanotubes as plant growth regulators: effects on tomato growth, reproductive system, and soil microbial community. Small 14: 115-23.

Kim DH, Gopal J, Sivanesan I (2017) Nanomaterials in plant tissue culture: the disclosed and undisclosed. RSC advances 7, 36492-36505.

Malik WA, Mahmood I, Razzaq A et al. (2021) Exploring potential of copper and silver nano particles to establish efficient callogenesis and regeneration system for wheat (*Triticum aestivum* L.). GM Crops Food 12, 1–22.

Mazri MA, Belkoura I, Meziani R et al. (2017) Somatic embryogenesis from bud and leaf explants of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Najda. 3 Biotech 7, 58.

Mohammadabadi MR, El-Tamimy M, Gianello R, Mozafari MR (2009) Supramolecular assemblies of zwitterionic nanoliposome-polynucleotide complexes as gene transfer vectors: Nanolipoplex formulation and in vitro characterization. J Liposome Res 19 (2), 105-115.

Mohammadabadi MR, Mozafari MR (2018) Enhanced efficacy and bioavailability of thymoquinone using nanoliposomal dosage form. J Drug Deliv Sci Technol 47 (1), 445–453.

Mohammadabadi MR, Mozafari MR (2019) Development of nanoliposome-encapsulated thymoquinone: evaluation of loading efficiency and particle characterization. J Biopharm 11 (4), 39-46

Morsy MK, Khalaf HH, Sharoba AM et al. (2014) Incorporation of essential oils and nanoparticles in pullulan films to control foodborne pathogens on meat and poultry products. J Food Sci 79, M675–M684.

Mortazavi SM, Mohammadabadi MR, Mozafari MR (2005) Applications and in vivo behaviour of lipid vesicles. Nanoliposomes From Fundamentals to Recent Developments. Trafford Publishing. England. 67-76

Pandey K, Lahiani MH, Hicks VK et al. (2018) Effects of carbon-based nanomaterials on seed germination, biomass accumulation and salt stress response of bioenergy crops. PloS one 13, 1-17.

Rad MR, Zarghami R, Hassani H, Zakizadeh H (2015) Comparison of vegetative buds formation in two date palm cultivars, Medjool and Mazafati through direct organogenesis. Int J Farm Alli Sci 4, 549-553.

Rohim FM, El-Wakeel H, El-Hamid A et al. (2020) Impact of Nanoparticles of In Vitro Propagation of Date Palm cv. Barhee by Immature Inflorescences. Arab Universities J Agric Sci 28, 1187-1202.

Salaün C, Lepiniec L, Dubreucq B (2021) Genetic and Molecular Control of Somatic Embryogenesis. Plants 10, 1467.

Sané D, Aberlenc-Bertossi F, Diatta LI et al. (2012) Influence of Growth Regulators on Callogenesis and Somatic Embryo Development in Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Sahelian Cultivars. Sci World J 1-8.

Sarmast MK, Salehi H (2016) Silver Nanoparticles: An Influential Element in Plant Nanobiotechnology. Mol Biotech 58, 441-449.

Saxena R, Kumar M, Tomar RS (2020) Implementation of Nanotechnology in Agriculture System: A Current Perspective. Nanobiotech pp.211-227.

Shang Y, Hasan Md, Ahammed G et al. (2019) Applications of Nanotechnology in Plant Growth and Crop Protection: A Review. Molecules 24, 2558.

Solanki P, Bhargava A, Chhipa H et al. (2015) Nano-fertilizers and their smart delivery system. In: Nanotechnologies in Food and Agriculture. Springer 81–101.

Taha RA, Hassan MM, Ebrahim EA et al. (2016) Carbon nanotubes impact on date palm in vitro cultures. Plant Cell Tiss Organ Cult 127, 525–534.

Wu T, Li J, Zhang J et al. (2018) Graphene oxide inhibits the lethal browning of Cymbidium sinense by reducing activities of enzymes. J Plant Biotech Microbiol 1, 20-29.

Zarrabi A, Alipoor Amro Abadi M, Khorasani S et al. (2020) Nanoliposomes and Tocosomes as Multifunctional Nanocarriers for the Encapsulation of Nutraceutical and Dietary Molecules. Molecules 25 (3), e638.

Zaytseva O, Neumann, G (2016) Phytotoxicity of carbon nanotubes is associated with disturbances of zinc homeostasis. Eur Chem Bull 5, 238–244.

Zhang M, Gao B, Chen J, Li Y (2015) Effects of graphene on seed germination and seedling growth. J Nanopart Res 17, 78.

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500