بررسی امکان استفاده از هیدروژل نانوکامپوزیتی به عنوان جایگزین آگار در کشت درون شیشه ای گیاه بنفشه آفریقایی

شهره خوش بین[1*]، موسی سلگی[2]،مینا تقی زاده[2]، محمد جعفر رضایانی[3]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد علوم باغبانی، دانشگاه اراک. ۲- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه اراک. ۲- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه اراک.۳-دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی پلیمر، دانشگاه اراک.

*نویسنده مسئول: Shohreh_khoshbin@yahoo.com

چکیده

یکی از برجسته ترین فناوری های در دست بررسی در مهندسی کشاورزی نانو کامپوزیت های هیدروژل می باشد که به دلیل ویژگی های منحصر به فرد از قبیل رهایش کنترل شده آب و مواد مورد نیاز برای تغذیه گیاه مانند کود ها، خواص آنتی باکتریالی، زیست تخریب پذیر بودن و زیست سازگاری مورد توجه ویژه پژوهشگران قرار گرفته است. به نانو کامپوزیتی که خاصیت آب دوستی داشته و جاذب آب باشد هیدروژل گویند. جهت بهبود خواص این ماده، از موادی مانند نانوزئولیت درطی فرایند تولید استفاده شد. کاربرد هیدروژل ها در کشاورزی در کشت مزرعه ای (خاکی) مورد استفاده قرار گرفته است اما در این پژوهش با توجه به ویژگی های جالب توجهی که با تغییر در ساختار آن می توان القا کرد و همچنین ساختار فیزیکی مشابه با آگار و بی اثر بودن آن تصمیم به ارزیابی امکان کاربرد نانوکامپوزیت ها در کشت گیاه درشرایط درون شیشه ای گرفته شد. ریزنمونه از گیاه بنفشه افریقایی گرفته شد وهیدروژل بر پایه پلیمری پلی اتیلن گلایکول و ترکیبات شیمیایی متفاوت مورد ارزیابی قرار گرفت. به طورکلی ریزنمونه روی هیدروژل تنها پس از یک روز بدلایل مختلف کاملا نکروزه می شود در حالی که با تغییراتی که طی این پروژه در ترکیب شیمیایی ژل ایجاد شد ماندگاری ریزنمونه به 8 روز افزایش یافت که نتیجه امیدوارکننده ای محسوب می شود و کار و بررسی بیشتر دراین زمینه را نوید می دهد.

کلمات کلیدی: آگار، بنفشه افریقایی، کشت درون شیشه ای، هیدروژل نانوکامپوزیت

مقدمه

درطی دهه های اخیر شاخه جدیدی از مواد کامپوزیتی بنام نانوکامپوزیت ها به دلیل پیوندهای قوی تر و تاثیرگذاری بهتر با ترکیبی از فناوری نانو و فناوری مواد کامپوزیت ارائه و توسعه یافته است. براساس تعریف، نانوکامپوزیت به ماده مرکبی گفته می شود که حداقل یکی از فازهای تشکیل دهنده آن دارای ابعاد نانو (بین ۱ تا ۱۰۰ نانومتر) باشد. نانوکامپوزیت های پلیمری که در آن فاز زمینه ماده پلیمری است، یکی از مهم ترین دسته های مواد کامپوزیتی به شمار می آید (خطیبی، ۱۳۸۵).

ژل ها شبکه های پلیمری هستند که خاصیت نگهداری حلال در ساختمان خود را دارا هستند. از نظر شیمیایی ساختار یک ژل می تواند پلیمری باشد. در هر حال این ماده، ساختاری شبکه ای یا سه بعدی دارد که قابل حل شدن نمی باشد. هیدروژل سوپرجاذب پلیمری آبدوست با شبکه سه بعدی است که قابلیت جذب و نگهداری مقادیر زیاد آب و محلول های آبی را داراست اما غیر قابل حل است(Barati, 2003). توسعه هیدروژل ها با قدرت جذب بالا اولین بار در اواخر دهه ۷۰ میلادی رخ داد که موجب توسعه کاربرد هیدروژل ها گردید. سوپرجاذب ها کاربردهای گسترده و متنوعی در صنعت و کشاورزی دارند که از آن جمله می توان موارد ذیل را نام برد: جاذب های قوی آب، کنترل رهایش بعضی مواد، به عنوان جاذب برای حذف آلوده کننده های آب، غشاهای نیمه تراوا، وسایل بهداشتی و...امروزه شکل عمومی ذرات هیدروژل پلیمری بیشتر بصورت گرانول های با

اشکال نامنظم است(دلشاد خطیبی، ۱۳۷۵). نانوکامپوزیت هیدروژل را می توان با ترکیب کردن انواع مختلف نانوذرات از قبیل فلزی، معدنی و نانو لوله های کربنی با هیدروژل ها بدست آورد. زئولیت ها دسته ای از ترکیبات معدنی هستند که اولین بار در سال ۱۷۵۶ کشف شد. این کانی خصوصیات منحصربه فردی را شامل می شود، به همین دلیل ازسال ۱۸۶۲ اقدام به تولید آن بصورت صنعتی نیز گرفته شد. این کانی کاربردهای زیادی در صنعت و کشاورزی بخود اختصاص داده که در بحث کشاورزی می توان به مواردی همچون قابلیت آزادسازی تدریجی و کنترل شده مواد، افزایش راندمان مصرف کودها، تهویه هوا و اکسیژن رسانی، حذف فلزات سنگین از خاک های آلوده، جذب رطوبت و نگهداری آن برای مدت طولانی و جلوگیری از تنش خشکی، افزایش رشد گیاه و تعداد شاخ و برگ، افزایش جذب گیاه و استفاده از تمامی عناصر موجود در خاک و کاهش آفات و بیماری ها اشاره نمود (Polat, 2004). بعلت ظرفیت بالای زئولیت ها در جذب و نیز تبادل کاتیونی، کاربرد آنها در ساختار سوپرجاذب های مورد استفاده در کشاورزی و تولید نانوکامپوزیت ها از یک سو موجب بهبود خاصیت جذب آب و از سوی دیگر توانایی این مواد را برای رهایش کنترل شده عناصر بالا می برد (C.A,T.C, 1998) .

بنفشه ی آفریقایی یکی از مهمترین گیاهان زینتی بومی مناطق گرمسیری متعلق به خانواده *Gesneariaceae* می باشد که به عنوان گیاه گلدانی گلدار در بسیاری از نقاط دنیا در شرایط گلخانه پرورش داده می شود و توانایی تولید گل در طول سال را دارد. اولین گیاه بنفشه آفریقایی که به رنگ بنفش بود در آفریقا و توسط Baron Walter von Saint Paul کشف شد. امروزه این گونه بالغ بر ۲۰۰۰۰ واریته دارد(khan,2007) .این گیاه زینتی به عنوان یک گیاه مدل با ارزش جهت مطالعات باززایی در شرایط درون شیشه‌ای مطرح می‌باشد. از مزایای استفاده از تکنیک کشت بافت در مقایسه با روش متداول قلمه در مورد این گیاه می‌توان تکثیر انبوه ارقام مختلف، تولید گیاهانی یکنواخت و متقارن، نیاز به فضای کمتر برای تکثیر و کاهش آلودگی در محیط تکثیر را نام برد. از مهمترین مزایای کشت درون شیشه ای این گیاه ایجاد گونه های جدید و تکثیر انواع دارای بافت ناهمسان می باشد که از طریق دیگر روشها امکانپذیر نیست (Dole,1999). در دو دهه ی اخیر دانش نانوفناوری وارد بخش های مختلف تحقیقاتی و زندگی انسان ها شده و از این رو در سراسر دنیا تحقیق و توسعه در این زمینه به سرعت در حال رشد می باشد (Navarro,2008). بطور کلی نانوفناوری شامل زیر بخش های گوناگونی مانند نانولوله ها ، نانوحس گرها و نانومواد می باشند که هر کدام از آنها کاربردهای فراوانی در صنعت، پزشکی، علوم زیستی و کشاورزی دارند. نانومواد نیز شامل زیر مجموعه هایی بوده که یکی از کاربردی ترین آنها نانوکامپوزیت ها هستند. نانوکامپوزیت ها بوسیله ی داربست های پلیمری متفاوت قابل تهیه می باشند و کارخانجات تولیدی آن نیز در سراسر کشور مشغول به تهیه این مواد باکاربردهای متفاوت می باشند و اتفاقا یکی از پتانسیل های کاربرد این ماده ارزان قیمت بودن و سهولت تهیه آن نسبت به آگار که یکی از گران قیمت ترین مواد آزمایشگاهی در کشت بافت محسوب می شود، می باشد .

مواد و روش‌ها

۱- تهیه ریز نمونه ها: در این بخش قطعات برگی گیاه بنفشه آفریقایی *Saintpaulia ionantha* استفاده شد. محیط کشت مورد استفاده موراشیگ و اسکوگ تجاری (MS) بود. این محیط کشت با ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۲ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین تکمیل شد.

۲-تهیه محیط کشت بر پایه پلیمر

۲-۱ هیدروژل فوق جاذب کاتیونی (بجهت ارزیابی میزان زنده مانی ریزنمونه برهیدروژل معمولی) بر پایه آکریل آمید و کومونومر یونی متاکریل آمید پروپیل تری متیل آمونیوم کلراید MAPTAC ساخته شد (هیدروژل معمول در کشاورزی)

۲-۲ نمونه جدید ژل با تغییر در نوع مونومرها ، عوامل اتصال دهنده عرضی و شرایط آزمایشگاهی برای دستیابی به ویژگی های مطلوب تولید شد.(هیدروژل ساخته شده با هدف جایگزینی بجای آگار)

۳- کشت ریزنمونه ها: ریزنمونه های گندزدایی شده در محیط کشت با ترکیب جدید ۶/۵ گرم در لیتر هیدروژل برپایه پلی اتیلن گلایکول، کشت شدند و pH محیط کشت به میزان ۵/۷ تنظیم شد. سپس محیط در پتری دیش های ۱۰ سانتی متری توزیع شدند. در نهایت پتری دیش های حاوی ریزنمونه های کشت شده در درون اتاقک کشت تحت شرایط دمایی ۲۴ ± ۲ درجه سانتی گراد و دوره نور به مدت ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند.

۴- ارزیابی صفات: در این آزمایش پیدایش علائم قهوه ای شدن و از بین رفتن در ریزنمونه ها در طی یک الی دو هفته و احتمال بروز آلودگی های باکتریایی و قارچی پس از حدود یک ماه بررسی گردید.

نتایج و بحث

در قدم اول با بکارگیری هیدروژل کشاورزی و آزمایش زنده مانی ریزنمونه روی محیط کشت قهوه ای شدن و از بین رفتن ریزنمونه پس از گذشت کمتر از ۲۴ ساعت مشاهده شد. دلیل این مساله عوامل متعددی می تواند باشد مثل وجود مونومرهای آزاد باقی مانده بر روی محیط کشت که در فرایند تشکیل پلیمریزاسیون شرکت نکرده اند به این دلیل که مونومرهای تشکیل دهنده ژل در حالت آزاد هنگامی که با مونومرهای دیگر تشکیل پلیمر نداده باشند حالت سمی از خود نشان می دهند که این پدیده پس از تشکیل پلیمر از بین رفته و سمیت ژل تشکیل شده تا مقدار زیادی کاهش پیدا می کند. دلیل دیگر در ایجاد این پدیده می تواند وجود ماده آمونیوم پرسولفات APS در فرایند تشکیل ژل باشد به دلیل اینکه این ماده درنوع خود تاحدی سمیت داشته و به همین دلیل درکاربردهای پزشکی ژل‌ها، میزان APS را در حداقل ممکن استفاده می کنند، ازاین رو طی آزمایشات متعدد و تست سمیت، میزان این ماده از ۰/۷۵ گرم به ۰/۱ گرم رسانده شد که از این مقدارکمتر عمل پلیمریزاسیون با اشکال مواجه شده و ژل تشکیل نمی شد. دلیل احتمالی دیگر کاربرد A Acid و A Amid در هیدروژل بود که این مونومرها در ژل جدید جایگزین شدند (شکل ۱و ۲).

شکل ۱

شکل ۲

شکل ۱: کشت ریزنمونه بر محیط کشت حاوی هیدروژل شکل ۲: نکروزگی و از بین رفتن بافت برگ پس از گذشت ۲۴ ساعت را مشاهده می شود.

در گام بعدی تصمیم بر تولید محیط کشتی بر پایه پلیمرزیست تخریب پذیر پلی اتیلن گلایکول (PEG) با هدف کشت بافت گرفته شد. ماده ای بی اثر و سازگار با بدن موجودات زنده، بطوریکه کاربرد آن در تهیه مواد دارویی خوراکی و کشت موجودات

تک سلولی موفق بوده است (یگانه،۱۳۹۰). قبل از تشکیل ژل مواد محیط کشت از قبیل MS، ساکارز و هورمون به آن اضافه شد و سپس آکریل آمید، متیلن بیس آکریل آمید و و آمونیوم پر سولفات به ترتیب به عنوان مونومر پایه ، عامل اتصال عرضی شبکه و آغازگر به محلول آبی اضافه شد، سپس با افزودن (NaOH)، متاآکریلیک اسید(MAAC)، به ترتیب به عنوان عامل بازی و عامل اسیدی، میزان pH محیط تنظیم گردید. در مرحله آخر نانوذرات زئولیت بعد از قرار گرفتن در حمام فراصوتی به مدت پنج دقیقه جهت جلوگیری از کلوخه شدن، به محلول نهایی اضافه شد و فرایند پلیمریزاسیون هیدروژل نانو کامپوزیت در حمام آب گرم با دمای ۷۰ درجه سانتیگراد بمدت ۱۵ دقیقه انجام شد. درطی انجام عمل پلیمریزاسیون درحین تشکیل ژل دمای محلول خودبخود بمدت چندین دقیقه به حدود ۱۲۰ درجه سانتیگراد افزایش پیداکرده و همین فرایند باعث استریل شدن محیط کشت خواهد شد.این مساله یک امتیاز مثبت دربحث ضدعفونی سازی محیط کشت بافت محسوب شده و نیاز به فرایند اتوکلاو را مرتفع می سازد.سپس بمنظور جداسازی مونومرهایی که موفق به شرکت در پلیمریزاسیون نشده اند محیط کشت را بمدت ۲۴ ساعت داخل آب مقطر قرار داده و سپس کشت را روی آن انجام دادیم. طی بررسی های بعمل آمده مشاهده شد ریزنمونه کشت شده بر روی این ژل بمدت ۷ الی ۸ روز طراوت خود را روی محیط حفظ کرده و این نشان دهنده موفقیت در به حداقل رساندن سمیت ژل و تغذیه گیاه درطی این زمان بود. نتیجه این آزمایش و افزایش طول عمر ریزنمونه از یک روز به ۸ روز بر روی ژل، فعالیت های بیشتر و پژوهش دراین حوزه از علم را نوید می دهد.

دراین پروژه با تغییر در میزان مواد تشکیل دهنده سعی در تولید مناسب ترین ژل با بیشترین شباهت با آگار و حداقل سمیت، جهت کشت بافت گیاهی بود چراکه از ویژگی های مهم این ماده عدم فاسد شدن و تغذیه کنترل شده ریزنمونه می باشد. نمونه قرار داده شده در هر دو محیط کشت آگار و هیدروژل پس از یک هفته بررسی شد. طبق شکل نمونه موجود در محیط کشت هیدروژل کاملا تازه و عاری از هر گونه اثر سمیت از قبیل نرم شدگی برگ و قهوه ای شدن بود. ویژگی موردتوجه بعدی عدم حضورقارچ هاو آلودگی های باکتریایی بر روی محیط کشت بود که پس ازسه هفته این آلودگی ها بر روی نمونه کشت شده در آگارمشاهده شد.

شکل۱: عکس سمت راست ریزنمونه کشت شده درهیدروژل نانوکامپوزیت، عکس سمت چپ ریزنمونه در آگار را پس از یک هفته کشت نشان می دهد. مشاهده می شود که ریزنمونه سمت راست پس از مدت یک هفته طراوت خود را حفظ کرده است.

منابع

۱. دلشاد خطیبی.،سعیدی. و لطیفیان. ۱۳۸۵. نانوساختارها و نانو کامپوزیت ها، دانش پویان جوان، ۱۴۸-۱۴۷

۲. یگانه ع.، ۱۳۹۰. ساخت و بررسی خواص داربست های نانوکامپوزیتی پلی متاآکریل آمید و نانوزئولیت جهت بررسی رشد و تکثیر سلول عصبی

3. A. Barati, E. vasheghani Farahani, Swelling behavior of superabsorbent agriculture hydrogels in electrolyte solution and under compressive load, 6th Ispst, 2003

4. C. A. T. C. United State Enviroment Protection, Zeolite a versatitle air pollution adsorber, 456: 1-8, 1998.

5.Khan, S., S.Nassb and K.Ali. 2007. Callus induction, plant regeneration and acclimization of African Violet *(Saintpaulia ionantha)* using leaves as explants. Pakistan Journal of Botany 39(4): 1263-1268.

6. Dole, J. M. and H. F. Wilkins. 1999. Floiculture: Principles and Species. Prentice Hall Pub. Washington. USA. pp: 508-513.

7. Navarro, E., A. Baun, R. Behra, NB. Hartman, J. Filser, AJ. Miao, A. Quiagg, PH. Santschi and L. Sigg. 2008. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae,

8. Polat,E., karaca,m,. Demir,H and nacionus,A 2004.use of natural zeolite in agriculture .journal of frui and ornamental plant research.

The possibility of using nanocomposite hydrogels as a substitute for agar in vitro culture of *Saintpaulia ionantha*

SH.Khoshbin[1*], M.Solgi[2], M.Taghizadeh[3], M.J.Rezayani[4]

*Corresponding author: Shohreh_khoshbin@yahoo.com

Abstract

Hydrogel nano composites are one of the most prominent technologies in the field of agricultural engineering. Because of unique features such as controlled release of water, materials needed for plant nutrition like fertilizers, antibacterial and antioxidant properties ,biodegradable and eco-compatibility are of special interest to researchers. Hydrogels are interconnected networks with water absorption property. Hydrogel used in the agricultural field cultivation (soil) is used But in this study, due to the remarkable features that come with the change in its structure can be instilled and similar physical structure as well as with agar and its ineffective decided to evaluate the feasibility of the application of inherent within the plant cultivation in the manufacture of glass. we used nano zeolite To improve mechanical and releasing properties .hydrogel were used in soil caltivation but in this research because of special. properties of this kind of hydrogels and similarity to Agar we decided to use this kind of nanocomposites in tissue culture. We applied African violet explants and hydrogel based on poly ethylene glycol was made. Explants on hydrogel were necrosede only in 12 hours after cultivation, but with some changes on nanocomposite comount we decresed toxity agent and increased life time of explants to 7 days.it is so hopeful to get better resoult in this field.

Key words: Agar, African violet, In Vitro, Nanocomposite hydrogel