باززایی و شاخساره زایی ریزنمونه‌های بنفشه آفریقایی با استفاده از نانوذرات نقره تولید شده توسط گیاهان

موسی سلگی1 *، مینا تقی زاده1
1- دانشگاه اراک – دانشکده کشاورزی – گروه مهندسی باغبانی- کد پستی 38156-8-8349
*مسئول مکاتبات

چکیده

کشت درون شیشه‌ای بنفشه‌ی آفریقایی بدلیل تولید کولتیوارهای جدید و تکثیر انواع دارای بافت ناهمسان از اهمیت زیادی برخوردار است. در این تحقیق تاثیر نانوذرات نقره ساخته شده توسط عصاره‌های پوست انار و گلبرگهای گل محمدی بر میزان باززایی و شاخساره‌زایی ریزنمونه های بنفشه آفریقایی بررسی شد. در این آزمایش از نسبتهای حجمی1:20، 1:10، 1:5، 1:1 (نیترات نقره : عصاره) و محلول نیترات نقره یک میلی مولار بعنوان شاهد استفاده شدند. نتایج نشان داد که نانوذرات نقره تولید شده توسط دو نوع عصاره بویژه گل محمدی موجب بالاترین میزان باززایی و شاخساره‌زایی ریزنمونه در مقایسه با سایر غلظت‌ها شده و بخوبی توانستند آلودگی‌های موجود در محیط کشت بنفشه آفریقایی را در مقایسه با نیترات نقره کنترل نمایند و تیمار 1:20 نانوذرات نقره بهترین غلظت بمنظور باززایی و شاخساره زایی ریزنمونه‌های بنفشه آفریقایی بود. بطور کلی نانوذرات نقره تولید شده سازگار با طبیعت توسط عصاره این گیاهان می توانند کاربرد مناسبی در کشت درون شیشه ای بنفشه آفریقایی در مقایسه با ترکیبات شیمیایی دیگر مانند نیترات نقره داشته باشند.

کلمات کلیدی: انار، شاخساره زایی، ضدمیکروبی، کشت درون شیشه ای و گل محمدی

مقدمه

بنفشه‌ی آفریقایی1 یکی از مهمترین گیاهان زینتی بومی مناطق گرمسیری متعلق به خانواده Gesneariaceae می باشد که بعنوان گیاه گلدانی گلدار در بسیاری از نقاط دنیا پرورش داده می شود و توانایی تولید گل در طول سال را دارد (5). روشهای تکثیر آن شامل بذر برای مقاصد اصلاحی، قلمه‌ی برگ و کشت درون شیشه ای می باشد. از مزایای استفاده از تکنیک کشت بافت 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. اما مهمترین مزایای کشت درون شیشه ای این گیاه ایجاد کولتیوارهای جدید و تکثیر انواع دارای بافت ناهمسان2 می باشد که از طریق دیگر روشها امکانپذیر نیست (4 و 2). از این رو کشت درون شیشه ای این گیاه زینتی از اهمیت بالای برخوردار است.

دانش نانوفناوری وارد بخش‌های مختلف تحقیقاتی و زندگی انسان ها شده است و به سرعت در حال رشد می‌باشد (6 و 9). نانوفناوری شامل زیربخشهای گوناگونی بوده که هر کدام از آنها کاربردهای فراوانی در صنعت، پزشکی، علوم زیستی و کشاورزی دارند. نانومواد بویژه نانوذرات فلزات3 یکی از مهمترین و کاربردی‌ترین این زیرمجموعه‌ها می باشد. نانوذرات به موادی گفته می‌شود که همگی دارای ابعاد یکسان بوده و اندازه‌هایشان کمتر از 100 نانومتر باشد. نانوذرات فلزاتی مانند نقره و طلا بدلیل داشتن ویژگیهای خاص نوری، کاتالیکی، مغناطیسی و الکتریکی بسیار مورد توجه قرار گرفته اند (6 و 10). اثرات ضد باکتریایی یون نقره روی میکروارگانیسم‌ها بویژه باکتری ها تا حدود زیادی شناخته شده بطوریکه یونهای نقره با گروههای تیول (SH-) آنزیم

1- *Saintpaulha ionantha* Wendl.
2- Chimera
3 - Metals nanoparticles

های حیاتی باکتریها برهمکنش نشان داده و بدین طریق باعث غیرفعال شدن آنها می‌شود (8 و 10). از اثرات ضد میکروبی[1] نانوذرات نقره (+Ag) استفاده های فراوانی در میکروبیولوژی، زیست شناسی، پزشکی و کشاورزی می‌شود (7 و 9). بعنوان مثال 10، 20 و 50 قسمت در میلیون[2] نانوذرات نقره به ترتیب باعث 75، 95 و 100% بازدارندگی رشد باکتری Escherichia coli شده (13) و یا یک قسمت در میلیون نانوذرات نقره علیه فعالیت باکتریهای Salmonella typhi و Escherichia coli بسیار موثر بوده است (12). از سوی دیگر نانوذرات نقره می توانند کاربرد موثری در گندزدایی ریزنمونه‌های گیاهی[3] کشت شده در محیط درون شیشه‌ای[4] نیز داشته باشند. زیرا به دلیل حضور ساکارز موجود در محیط کشت درون شیشه ای، میکروارگانیسم‌های متنوعی مانند باکتری و قارچ به سرعت سبب آلوده شدن سلولها و بافت های گیاهی می‌شوند. از این رو در کشت درون شیشه ای اندامها و بافتهای گیاهی توسط محلولهای مختلف شیمیایی مانند هیپوکلریت سدیم، پراکسید هیدروژن و نیترات نقره گندزدایی می شوند (6 و 14). از آنجایی که مقاومت باکتریها و قارچها به باکتری و قارچ‌کشهای معمول از جمله عوامل محدود کننده آنها در گندزدایی کردن مواد گیاهی و محیط کشت می‌باشد، تمایل زیادی به استفاده از ترکیبات جایگزین و مواد جدیدی مانند نانوذرات نقره می باشد (6 و 11). گزارش‌های اولیه در این زمینه با کاربرد غلظتهای 25، 50 و 100 میلی گرم در لیتر نانوذرات نقره تولید شده به روش شیمیایی در چهار زمان کاربرد در طی دو مرحله نشان دادند که 100 میلی گرم در لیتر پس از 180 دقیقه موجب بیشترین درصد ضدعفونی (89%) ریزنمونه‌های گیاه دارویی سنبل الطیب[5] گردید (1). در گزارشی دیگر با استفاده از نانوذرات نقره در چهار غلظت برای گندزدایی ریزنمونه‌های تک گره گردو به صورت غوطه‌وری نتیجه گرفتند که غلظت 75 قسمت در میلیون از نظر کنترل آلودگی باکتری و زنده‌مانی‌جوانه های گردو بهترین بوده که اختلاف معنی‌داری با دیگر تیمارها داشت ولیکن از نظر کنترل آلودگی قارچی اختلاف معنی‌داری بین غلظت ها و شاهد وجود نداشت (3). از این رو مهمترین هدف این تحقیق جایگزین نمودن نانوذرات نقره تشکیل شده با استفاده از دو نوع عصاره پوست انار و گلبرگهای گل محمدی بجای مواد شیمیایی متداول مانند و نیترات نقره و تاثیر آنها بر میزان باززایی و شاخساره‌زایی ریزنمونه ها می‌باشد.

مواد و روشها

1- تهیه ی ریزنمونه ها و اعمال تیمارهای گندزدایی ریزنمونه ها

در ابتدا برگهای بنفشه آفریقایی در زیر آب جاری به مدت 20 دقیقه شسته شدند. سپس دمبرگ برگها جدا و پهنکها به قطعاتی به اندازه یک در یک سانتیمتر توسط اسکالپل تیز در زیر هود لامینار بریده شده و با اتانول 70 درصد به مدت 30 ثانیه گندزدایی شدند. در ادامه ریزنمونه‌های گندزدایی شده سه بار توسط آب مقطر استریل شستشو داده شدند. نانوذرات نقره ساخته شده به روش سبز[6] با استفاده از عصاره‌های گلبرگهای گل محمدی و پوست انار که از محلول نیترات نقره یک میلی مولار ساخته شدند در مطالعه قبلی بعنوان تیمارهای گندزدایی در این تحقیق بکار گرفته شدند (11). سپس تیمارهای مورد نظر که شامل نانوذرات نقره در غلظت‌های 1:20 (SNP20)، 1:10 (SNP10)، 1:5 (SNP5) و 1:1 (SNP1) و نیترات نقره یک میلی مولار بعنوان شاهد[7] به مدت 10 دقیقه بکار گرفته شدند. پس از اعمال این تیمارها ریزنمونه ها مجدداً سه مرتبه توسط آب مقطر استریل آبکشی شدند.

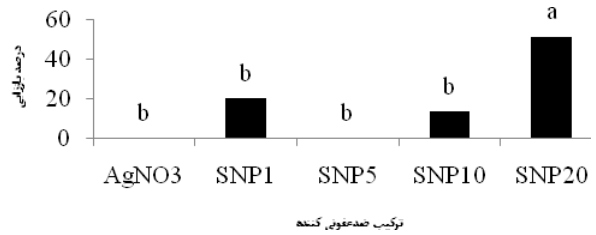
2- کشت ریزنمونه ها و ارزیابی صفات و تجزیه و تحلیل آماری

1 - Antimicrobial
2 - ppm
3 - Explants
4 - *In Vitro*
5 - *Valeriana officinalis*
6- Silver nanoparticles Green Synthesis
7 - Control

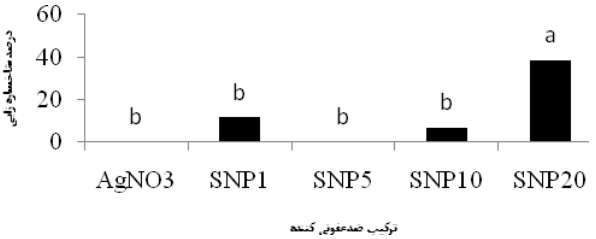
بعد از اتمام مراحل گندزدایی، ریزنمونه ها در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ تکمیل شده با 30 گرم در لیتر ساکارز، 6/5 گرم در لیتر آگار و دو میلی گرم در لیتر هورمون بنزیل آدنین کشت شدند. قبل از اتوکلاو کردن pH محیط کشت به میزان 5/7 تنظیم شده و سپس محیط کشت در 121 درجه سانتیگراد به مدت 20 دقیقه اتوکلاو گردیده و سپس از اتوکلاو کردن در پتری‌دیشهای 10 سانتی متری توزیع شدند. در نهایت پتری دیشهای حاوی ریزنمونه های کشت شده در درون اتاقک کشت تحت شرایط دمایی 24 ± 2 درجه سانتیگراد و دوره نور به مدت 16 ساعت روشنایی و 8 ساعت تاریکی نگهداری شدند. در این آزمایش درصد باززایی و شاخساره‌زایی ریزنمونه‌ها پس از یک ماه یادداشت گردید. این آزمایش بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. هر تیمار دارای سه تکرار و با پنج ریزنمونه در هر تکرار بود. تجزیه واریانس داده‌های حاصله با استفاده از نرم افزار SAS انجام شد. آزمون چند دامنه ای دانکن برای تعیین تفاوت آماری بین میانگین تیمارها در سطح احتمال 5 درصد و برای رسم نمودارها نیز نرم افزار EXCEL بکار گرفته شد.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس پس از یک ماه نشان داد که فقط اثر نوع ترکیب گندزدایی‌کننده بر درصد باززایی و شاخساره‌زایی ریزنمونه-ها در سطح 5 درصد معنی‌دار شده است که نمودارهای آن در شکلهای 1 و 2 نشان داده شده‌اند. مقایسه میانگین غلظتهای مختلف (ترکیبهای ضد عفونی کننده) بر میزان باززایی ریزنمونه ها نشان می‌دهد که غلظت 1:20 (SNP20) از نظر آماری با شاهد و دیگر تیمارها تفاوت معنی‌دار داشته بنحوی که داری بیشترین درصد باززایی (52 درصد) یک ماه پس از کشت بوده است (شکل 1). در ضمن بدلیل آلودگی تیمارهای نیترات نقره و SNP5 قبل از باززایی از بین رفتند بنابراین هیچ گونه باززایی از خود نشان ندادند (شکل 8). مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف (ترکیب‌های گندزدایی‌کننده) بر میزان شاخساره‌زایی ریز نمونه ها در شکل 2 نیز نشانگر این است که غلظت SNP20 از نظر آماری با شاهد و دیگر تیمارها تفاوت معنی‌دار داشته بنحوی که داری بیشترین درصد میزان شاخساره‌زایی (38 درصد) یک ماه پس از کشت بوده است (شکل 2). در ضمن تیمارهای نیترات نقره و SNP5 که بدلیل هیچ گونه باززایی (شکل 1) تولید هیچ شاخساره ای ننمودند (تصویر 3).



شکل 1- تاثیر غلظتهای مختلف نانوذرات حاصله و نیترات نقره بر درصد باززایی ریز نمونه های بنفشه آفریقایی پس از یک ماه



شکل 2- تاثیر غلظتهای مختلف نانوذرات و نیترات نقره حاصله بر درصد شاخساره زایی ریزنمونه های بنفشه آفریقایی پس از یک ماه

تصویر 3- به ترتیب از راست به چپ؛ شروع باززایی ریزنمونه های بنفشه آفریقایی پس از سه هفته، تشکیل شاخساره ها پس از یک ماه تحت تیمار SNP20، تیمار شاهد نیترات نقره و تیمار SNP5

در این تحقیق باززایی و شاخسارهزایی خوب ریزنمونه های درون شیشه ای بنفشه آفریقایی گندزدایی شده با نانوذرات نقره به ویژه در غلظت 1:20 بود که بیشترین میزان باززایی ریزنمونه ها را داشت. این نتیجه نیز با یافته های برخی پژوهشگران مشابهت داشت (1). البته عدم تاثیر منفی در رشد ریزنمونههای درون شیشهای را میتوان به دلیل اثرات غیرمستقیم در کنترل بیشتر آلودگیها و در نتیجه امکان رشد و باززایی بهتر ریزنمونه های بنفشه آفریقایی میباشد (11 و 14). پژوهشگران ساز و کار خواص ضدمیکروبی نانوذرات نقره را به واکنش قوی آنها با گروههای تیول آنزیم ها و پروتئینهای حیاتی و غیرفعال نمودن آنها، نفوذپذیری غشای سلول و تخریب برخی متابولیسمها مانند حمله به زنجیره تنفسی، اختلال در تقسیم DNA و در نهایت مرگ سلول میکروارگانیزمها مرتبط دانستهاند (8 و 10). در ضمن بر اساس نتایج به دست آمده نانوذرات نقره حاصل از عصاره گلبرگهای گل محمدی در کنترل آلودگی های قارچی و باکتریایی ریزنمونه های درون شیشه ای بنفشه آفریقایی بدلیل اثرات ضد میکروبی قوی بخوبی عمل نمودند (داده ها نشان داده نشده اند). بطور کلی غلظتهای کم نانوذرات نقره حاصل شده از عصاره گلبرگهای گل محمدی توانایی سبب بالاترین میزان باززایی و شاخساره زایی ریزنمونه های بنفشه آفریقایی داشتهاند و میتوانند جایگزین مناسبی برای ترکیباتی مانند نیترات نقره، هیپوکلرید سدیم و امثال آن باشند.

منابع

1- Abdi, G., H. Salehi and M. Kush-Khui. 2008. Nano silver: a novel nanomaterial for removal of bacterial contaminants in valerian (Valeriana officinalis L.) tissue culture. Acta Physiology Plant 30: 709-714.

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

3- Gharati, S., R. Zarghami., M. Amiri, K. Vahdati and E. Rostami. 2011. Effects of silver Naoparticles on Reduction of Bacterial Contamination and Viability of Persian walnut in In Vitro. In Proc. of the 7th Iranian Horticultural Congress. Esfahan, Iran. pp. 79. (In Farsi).

4- Khalighi, A. 1999. Floriculture. Rooz Bahan. Tehran. (In Farsi).

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

6- Kim, JH., AK. Lee and JK. Suh. 2005. Effect of certain pre-treatment substances on vase life and physiological characters in Lilium spp. Acta Horticulture 673: 307–314.

7- Maneerung, T., S. Tokura and R. Rujiravant. 2008. Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing. Carbohydrate Polymers 72: 43–51.

8- Morrones, JR., JL. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J. Kouri, JT. Ramirez and MJ. Yacamoo. 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. Nanotechnology 16: 2346-2353.

9- 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 nonoparticles to algae, plants, and fungi. Ecotoxicology 17: 372-386.

10- Rai, M., A. Yadav and A. Gade. 2009. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. Biotechnology Advances 27: 76–83.

11- Solgi, M. and M. Taghizadeh. 2012. Silver Nanoparticles Ecofriendly Synthesis by Two Medicinal Plants. International Journal of Nanomaterials and Biostructurs 2(4): 60-64.
12- Song, HY. KK. Ko and BT. Lee. 2006. Fabrication of silver Nanoparticles and their antimicrobial mechanisms. European Cell and Materials 11: 58.
13- Sondi, I. and B. Salopek-Sondi. 2004. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study as a model for Gram-negative bacteria. Journal of Colloid Interface Sciences 275: 177-182.
14- Torres, KT. 1989. Tissue Culture Techniques for Horticultural Crops. Published by Van Nostrand Reinhold, New Yourk.

Regeneration and Shoot Regeneration of African Violet Explants Using Green Produced Silver Nanoparticles by Plants

M. Solgi1* and M. Taghizadeh1
1- Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University, Arak 38156-8-8349, Iran.
* Corresponding author

Abstract
In Vitro culture of African violet (Saintpaulha ionantha) because of production of new cultivars and chimera's ones is so important. In this study, the effects of silver nanoparticles synthesized via pomegranate peels and Damask rose petals extracts on regeneration and shoot formation of African violet explants was evaluated. The volumetric ratios of 1:20, 1:10, 1:5 and 1:1 (plant extracts / silver nitrate ratio) and 1 mM silver nitrate solution as control were used in this experiment. According to the results, silver nanoparticles green synthesized by the plant extracts, especially damask rose petals extract, in comparison to silver nitrate as control causes the highest regeneration and shoot regeneration in comparison with other those of concentrations. The fungi or bacterial contamination of African violet leaves explants was controlled successfully by those. The 1:20 was the best ratio for regeneration and shoot regeneration of African violet explants. In conclusion, eco-friendly synthesized silver nanoparticles by these plant extracts could be a good substitution for another chemicals such as silver nitrate in In Vitro culture of African violet.
Keywords: Antimicrobial, Damask rose, In Vitro, Pomegranate, Shoot regeneration