[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1394.5.17.24.7]

[DOI: 10.18869/acadpub.jcpp.5.17.349]

گندزدایی کشت درون شیشه‌ای بنفشه آفریقایی با استفاده از نانوذرات نقره ساخته شده توسط دو عصاره گیاهی

موسی سلگی[1*] و مینا تقی‌زاده[1]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۲/۱۹ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۰/۲۳)

چکیده

از مهم‌ترین مزایای کشت درون شیشه‌ای بنفشهٔ آفریقایی (*Saintpaulha ionantha*) تولید ارقام جدید و تکثیر انواع دارای بافت ناهمسان می‌باشد که از طریق دیگر روش‌ها امکان‌پذیر نیست. از این‌رو گندزدایی ریزنمونه‌ها در کشت درون شیشه‌ای این گیاه زینتی از اهمیت زیادی برخوردار است. در این تحقیق تأثیر نانوذرات نقره ساخته شده توسط عصاره‌های پوست انار و گلبرگ‌های گل محمدی بر میزان گندزدایی (فعالیت ضد باکتریایی و ضد قارچی)، باززایی و شاخساره‌زایی ریزنمونه‌های بنفشه آفریقایی رقم Pink Amiss بررسی شد. در این آزمایش که به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شده، از نسبت‌های حجمی ۱:۲۰، ۱:۱۰، ۱:۵، ۱:۱ (نیترات نقره: عصاره) و محلول نیترات نقره یک میلی‌مولار به‌عنوان شاهد استفاده شد. نتایج نشان داد که نانوذرات نقره تولید شده توسط دو نوع عصاره به‌ویژه عصاره گل محمدی پس از یک و سه هفته به‌طور معنی‌داری توانستند آلودگی‌های ناشی از باکتری‌ها و قارچ‌های موجود در محیط کشت بنفشه آفریقایی را در مقایسه با نیترات نقره کنترل نمایند. اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بر میزان آلودگی باکتریایی و قارچی در مقایسه با نیترات نقره در سطح ۵ درصد معنی‌دار شده و غلظت ۱:۲۰ بهترین تیمار بود. در ضمن تیمار ۱:۲۰ نانوذرات نقره به‌طور معنی‌داری موجب بالاترین میزان باززایی به‌میزان ۵۲ درصد و شاخساره‌زایی به‌میزان ۳۸ درصد ریزنمونه در مقایسه با سایر غلظت‌ها شد. به‌طورکلی نانوذرات نقره تولید شده توسط عصاره‌های گیاهی می‌توانند جایگزین مناسبی برای گندزدایی ریزنمونه‌ها در مقایسه با ترکیبات شیمیایی دیگر مانند نیترات نقره باشد.

واژه‌های کلیدی: بنفشه آفریقایی، Pink Amiss، کشت درون شیشه‌ای، عصاره انار، ضد میکروبی و عصاره گل محمدی

۱. استادیاران گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه اراک، اراک

*. مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: M-solgi@araku.ac.ir

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1394.5.17.24.7]

[DOI: 10.18869/acadpub.jcpp.5.17.349]

مقدمه

بنفشه‌ی آفریقایی (*Saintpaulha ionantha*) یکی از مهم‌ترین گیاهان زینتی بومی مناطق گرمسیری متعلق به خانواده *Gesneariaceae* می‌باشد که به‌عنوان گیاه گلدانی گل‌دار در بسیاری از نقاط دنیا در شرایط گلخانه پرورش داده می‌شود 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. امرزه این گونه بالغ بر ۲۰۰۰۰ واریته دارد (٦). این گیاه بی‌تفاوت به طول روز، دارای عادت رشدی بدون ساقه (Rosette)، برگ‌های تخم مرغی شکل، دمبرگ‌های کرک‌دار و گل‌های پنج گلبرگی است. روش‌های تکثیر آن شامل بذر برای مقاصد اصلاحی، قلمه‌ی برگ و کشت درون شیشه‌ای می‌باشد. این گیاه زینتی به‌عنوان 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 شیشه‌ای این گیاه ایجاد گونه‌های جدید و تکثیر انواع دارای بافت ناهمسان (Chimera) می‌باشد که از طریق دیگر روش‌ها امکان‌پذیر نیست (۲ و ۵). از این‌رو گندزدایی ریزنمونه‌ها در کشت درون شیشه‌ای این گیاه زینتی از اهمیت بالایی برخوردار است.

در دو دهه‌ی اخیر دانش نانوفناوری وارد بخش‌های مختلف تحقیقاتی و زندگی انسان‌ها شده و از این‌رو در سراسر دنیا تحقیق و توسعه در این زمینه به سرعت در حال رشد می‌باشد. کل سرمایه گذاری جهانی در زمینه نانوتکنولوژی در سال ۲۰۰۵ حدود ۱۰ میلیارد دلار بوده و تخمین زده می‌شود ارزش سالانه محصولات مرتبط با آن در سال‌های ۲۰۱۵ – ۲۰۱۱ به رقم یک تریلیون دلار برسد (۷ و ۱۳). به‌طورکلی نانوفناوری شامل زیر بخش‌های گوناگونی مانند نانولوله‌ها (Nanotubes)، نانوحس‌گرها (Nano sensors) و نانومواد (Nano materials) می‌باشند که هر کدام از آنها کاربردهای فراوانی در صنعت، پزشکی، علوم زیستی و کشاورزی دارند. نانومواد نیز شامل زیر مجموعه‌هایی بوده که یکی از مهم‌ترین و کاربردی‌ترین آنها نانوذرات فلزات (Metals nanoparticles) هستند. به‌عبارتی مهم‌ترین محصول نانوتکنولوژی تولید مواد جدید در اندازه‌های نانومتری بوده که مهم‌ترین نوع آنها نانوذرات می‌باشند. نانوذرات به موادی گفته می‌شود که همگی دارای ابعاد یکسان بوده و اندازه‌های‌شان کمتر از ۱۰۰ نانومتر باشد. نانوذرات فلزاتی مانند نقره و طلا به دلیل داشتن ویژگی‌های خاص نوری (اپتیکی)، کاتالیکی، مغناطیسی و الکتریکی بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند (۷ و ۱۴).

اثرات ضد باکتریایی یون نقره روی میکروارگانیسم‌ها به‌ویژه باکتری‌ها تا حدود زیادی شناخته شده است. یون‌های نقره با گروه‌های تیول (SH-) آنزیم‌های حیاتی باکتری‌ها برهمکنش نشان داده و بدین طریق باعث غیر فعال شدن آنها می‌شود. در ضمن باکتری‌هایی که با یون‌های نقره تیمار شوند قادر به نسخه‌برداری و تولید مثل نیستند (۱۲ و ۱۴). اثرات ضد میکروبی (Antimicrobial) نانوذرات نقره (Ag^+) علیه طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها مانند باکتری، قارچ و ویروس توسط محققین مختلفی شناخته شده است و از این ویژگی استفاده‌های فراوانی در علوم میکروبیولوژی، زیست شناسی، پزشکی و کشاورزی می‌شود (۱۱ و ۱۳). به‌عنوان مثال در بخش میکروبیولوژی ۱۰، ۲۰ و ۵۰ قسمت در میلیون نانوذرات نقره به‌ترتیب باعث ۷۵، ۹۵ و ۱۰۰٪ بازدارندگی رشد باکتری *Escherichia coli* شده (۲۰) و یا یک قسمت در میلیون نانوذرات نقره علیه فعالیت باکتریهای *Salmonella typhi* و *Escherichia coli* و ۱۰ قسمت در میلیون علیه باکترهای *Staphylococcus aureus* و *Mycobacterium tuberculosis* بسیار مؤثر بوده است (۲۱). گزارش‌های گوناگونی در ارتباط با کاربرد نانوذرات نقره در پس از برداشت گل‌های شاخه بریده ژربرا (۱۹)، رز، آکاسیا (۱۰) و سوسن (۷) شده است.

نانوذرات نقره می‌توانند کاربرد مؤثری در گندزدایی

ریزنمونه‌های گیاهی (Explants) کشت شده در محیط درون شیشه‌ای (*In Vitro*) نیز داشته باشند. زیرا به‌دلیل حضور منابع هیدروکربنی مانند ساکارز موجود در محیط کشت درون شیشه‌ای، میکروارگانیسم‌های متنوعی مانند باکتری و قارچ به سرعت سبب آلوده شدن سلول‌ها و بافت‌های گیاهی می‌شوند. از این‌رو در کشت درون شیشه‌ای اندام‌ها و بافت‌های گیاهی توسط محلول‌های مختلف شیمیایی گندزدایی می‌شوند. مهم‌ترین محلول‌هایی که برای گندزدایی نمودن ریزنمونه‌ها استفاده می‌شوند شامل هیپوکلریت کلسیم، هیپوکلریت سدیم، پراکسید هیدروژن، اتانول، نیترات نقره و کلرید جیوه می‌باشند (۷ و ۲۳). امروزه مقاومت باکتری‌ها و قارچ‌ها به باکتری و قارچ‌کش‌های معمول و هم‌چنین احتمال آسیب رساندن آنها به بافت‌های گیاهی از جمله عوامل محدود کننده آنها در گندزدایی کردن مواد گیاهی و محیط کشت توسط ترکیبات ذکر شده می‌باشد (۷ و ۱۵). بر این اساس تمایل زیادی به استفاده از ترکیبات جایگزین و مواد جدیدی که ایمن و مؤثر باشند وجود دارد. یکی از این مواد می‌تواند نانوذرات فلزاتی مانند نقره باشد. نانوذرات نقره (Ag^0) نسبت به ترکیباتی که از یون‌های نقره ساخته شده‌اند، دارای نسبت سطح به حجم بالاتری هستند. نسبت سطح به حجم ویژه در نانوذرات نقره موجب شده که واکنش تسریع کننده (کاتالیزوری) و فعالیت ضد میکروبی بسیار بالایی داشته باشند (۸ و ۲۰). با این حال، گزارش‌های اندکی در مورد کاربرد نانوذرات نقره برای گندزدایی کردن ریزنمونه‌ها در کشت درون شیشه‌ای وجود دارد. در گزارش‌های اولیه در این زمینه با کاربرد غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات نقره تولید شده به روش شیمیایی در چهار زمان کاربرد (۳۰، ۶۰ و ۱۸۰ دقیقه) در طی دو مرحله (قبل و بعد از گندزدایی به روش معمول) نشان دادند که ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر پس از ۱۸۰ دقیقه موجب بیشترین درصد ضد عفونی (۸۹٪) ریزنمونه‌های گیاه دارویی سنبل الطیب گردید (۱). در تحقیقی دیگر روی ریزنمونه‌های زیتون مشخص شد که نانوذرات نقره با غلظت‌های کم (۴ میلی‌گرم در لیتر) به‌خوبی توانستند آلودگی‌های قارچ و باکتری را بدون آسیب رساندن به ریزنمونه‌ها کنترل نمایند (۱۵). در گزارشی دیگر با استفاده از نانوذرات نقره در چهار غلظت (۰، ۷۰، ۱۰۰ و ۱۲۵ قسمت در میلیون) برای گندزدایی ریزنمونه‌های تک گره گردو به‌صورت غوطه‌وری نتیجه گرفتند که در بین غلظت‌های متفاوت از نظر کنترل آلودگی باکتری و زنده‌مانی‌جوانه‌های گردو بهترین غلظت ۷۵ قسمت در میلیون بوده که در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌داری با دیگر تیمارها داشت ولی از نظر کنترل آلودگی قارچی اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های نانوذرات نقره و شاهد وجود نداشته است (۴). وقتی که ریزنمونه‌های گیاهی درون محیط کشت قرار می‌گیرند، آلودگی‌های قارچی و باکتریایی شروع به گسترش می‌نمایند. از این‌رو از مهم‌ترین اهداف این تحقیق جایگزین نمودن نانوذرات نقره تشکیل شده با استفاده از دو نوع عصاره پوست انار و گلبرگ‌های گل محمدی به‌جای مواد شیمیایی متداول گندزدا مانند هیپوکلریت سدیم و نیترات نقره و نیز تأثیر آنها بر میزان باززایی و شاخساره‌زایی ریزنمونه‌ها می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه ریزنمونه‌ها

قطعات برگ بنفشه آفریقایی رقم Pink Amiss به‌عنوان ریزنمونه مورد استفاده قرار گرفتند. در ابتدا برگ‌های مورد نظر در زیر آب جاری به‌مدت ۲۰ دقیقه شسته شدند. سپس دمبرگ برگ‌ها جدا و پهنک‌ها به قطعاتی به اندازه یک در یک سانتی‌متر تحت شرایط استریل در زیر هود لامینار بریده شده و با اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۳۰ ثانیه گندزدایی شدند. سپس ریزنمونه‌های گندزدایی شده سه بار توسط آب مقطر استریل شستشو داده شدند (۲۲).

تهیه عصاره و گندزدایی ریزنمونه‌ها

نانوذرات نقره ساخته شده به روش سبز (Silver nanoparticles Green Synthesis) با استفاده از عصاره‌های گلبرگ‌های گل

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.22518517.1394.5.17.24.7]
[DOI: 10.18869/acadpub.jcpp.5.17.349]

محمدی و پوست انار که از محلول نیترات نقره یک میلی‌مولار ساخته شدند در مطالعه قبلی به‌عنوان تیمارهای گندزدایی در این تحقیق به‌کار گرفته شدند. به‌طور اختصار ۲/۵ گرم پودر گلبرگ‌های گل محمدی و پوست انار به ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر افزوده شده و سپس درون حمام آب گرم با دمای ۷۰-۶۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه همرا با شیکر شدن قرار داده شدند. پس از خنک شدن مخلوط حاصله در دمای اتاق، با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۴۰ فیلتر شده تا عصاره استخراجی به‌دست آید. رنگ این عصاره پس از صاف شدن قهوه‌ای بود و این عصاره برای تولید نانوذرات نقره در مراحل بعدی به‌کار برده شد. (۲ و ۱۷). پس از مرحله اولیه گندزدایی، تیمارهای مورد نظر که شامل نانوذرات نقره در غلظت‌های ۱:۲۰ (SNP (Silver Nanoparticles) 20) (یک میلی‌لیتر عصاره استخراجی پوست انار و یا گلبرگ‌های گل‌محمدی در ترکیب با ۲۰ میلی‌لیتر محلول نیترات نقره یک میلی‌مولار، ۱:۱۰ (SNP10)، ۱:۵ (SNP5) و ۱:۱ (SNP1) و نیترات نقره یک میلی مولار ($AgNO_3$) به‌عنوان شاهد به‌مدت ۱۰ دقیقه به‌کار گرفته شدند (۱۸ و ۲۲). پس از اعمال این تیمارها ریزنمونه‌ها مجدداً سه مرتبه توسط آب مقطر استریل شستشو داده شدند.

کشت ریزنمونه‌ها

ریزنمونه‌های گندزدایی شده در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) تکمیل شده با ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۶/۵ گرم در لیتر آگار و دو میلی‌گرم در لیتر هورمون سیتوکینینی بنزیل آدنین (BA) کشت شدند. قبل از اتوکلاو کردن pH محیط کشت به‌میزان ۵/۷ تنظیم شد. سپس محیط کشت در ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو گردید و در پتری‌دیش‌های ۱۰ سانتی‌متری توزیع شدند. در نهایت پتری‌دیش‌های حاوی ریزنمونه‌های کشت شده در درون اتاقک کشت تحت شرایط دمایی ۲۴ ± ۲ درجه سانتی‌گراد و دوره نور به‌مدت ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند.

ارزیابی صفات

در این آزمایش درصد آلودگی‌های باکتریایی، قارچی، پدیدار شدن علائم نکروتیک در ریزنمونه‌ها پس از دوره‌های یک و سه هفته‌ای و نیز درصد باززایی و شاخساره‌زایی ریزنمونه‌ها پس از یک ماه یادداشت گردید. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD) اجرا شد. هر تیمار دارای سه تکرار و با پنج ریزنمونه در هر تکرار بود.

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه واریانس (ANOVA) داده‌های حاصله با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام شد. آزمون چند دامنه‌ای دانکن (DMRT) برای تعیین تفاوت آماری بین میانگین تیمارها در سطح احتمال ۵ درصد و برای رسم نمودارها نیز نرم‌افزار EXCEL به‌کار گرفته شد.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس پس از یک هفته نشان داد (جدول ۱) که تنها اثر نوع عصاره بر میزان آلودگی باکتریایی در سطح ۵ درصد معنی‌دار شده است و نانوذرات نقره‌ی تولید شده توسط عصاره‌ی گلبرگ‌های گل محمدی به‌طور معنی‌داری سبب کنترل آلودگی باکتریایی در مقایسه با نانوذرات نقره‌ی تولید شده توسط عصاره‌ی پوست انار شده است (شکل ۱).

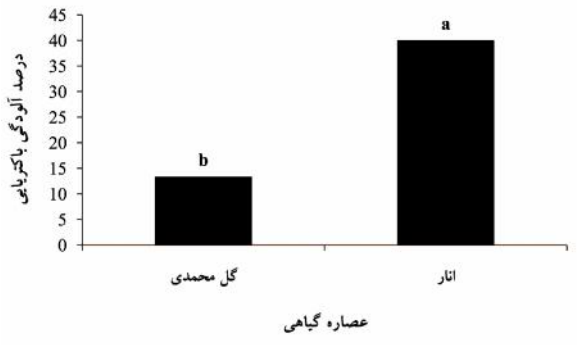
نتایج تجزیه واریانس پس از سه هفته نیز نشان داد که اثر نوع عصاره و اثر نوع ترکیب گندزدایی کننده (غلظت‌های مختلف) هم بر میزان آلودگی باکتریایی و هم آلودگی قارچی در سطح ۵ درصد معنی‌دار شده اما اثرات متقابل آنها معنی‌دار نشده‌اند (جدول ۱). مقایسه میانگین‌ها نشان می‌دهند که نانوذرات نقره‌ی تولید شده توسط عصاره‌ی گلبرگ‌های گل محمدی به‌طور معنی‌داری سبب کنترل هم آلودگی باکتریایی و هم آلودگی قارچی در مقایسه با نانوذرات نقره‌ی تولید شده توسط عصاره‌ی پوست انار شده‌اند (شکل‌های ۲ و ۳). مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره ساخته شده

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.22518517.1394.5.17.24.7]
[DOI: 10.18869/acadpub.jcpp.5.17.349]

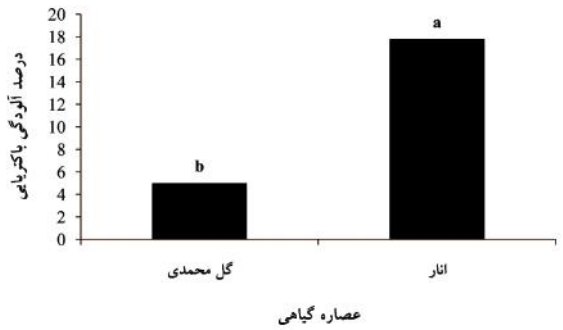
جدول ۱. نتایج تجزیه واریانس تأثیر دو نوع عصاره گیاهی و غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره ساخته شده بر میزان آلودگی باکتریایی و قارچی پس از یک و سه هفته و باززایی و شاخساره‌زایی ریزنمونه‌های بنفشه آفریقایی پس از یک ماه

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات					
		میزان آلودگی باکتریایی (پس از ۲۱ روز)	میزان آلودگی قارچی (پس از ۲۱ روز)	میزان آلودگی باکتریایی (پس از ۷ روز)	میزان آلودگی قارچی (پس از ۷ روز)	میزان باززایی (پس از یک ماه)	میزان شاخساره‌زایی (پس از یک ماه)
نوع عصاره	۱	۶۴۰۰/۰۰*	۱۰۶۷۷/۷۷**	۱۴۶۹/۴۴*	۱۱۱۱/۱۱*	۲۶۶۹/۴۴ns	۹۰۰/۰۰ns
غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره	۴	۳۷۶۶/۶۶**	۳۱۱۱/۱۱*	۶۴۹/۴۴ns	۸۵۱/۱۱ns	۲۶۹۱/۶۶*	۲۰۳۱/۱۱*
نوع عصاره × غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره	۴	۱۶۰۶/۶۶ns	۹۷۷/۷۷ns	۴۶۲/۷۷ns	۶۱۱/۱۱ns	۵۶۲/۷۷ns	۲۰۰/۰۰ns
خطای آزمایشی	۲۰	۸۹۲/۲۲	۹۸۳/۳۳	۳۱۶/۶۶	۱۸۸/۸۸	۷۸۰/۵۵	۶۸۳/۳۳
ضریب تغییرات (٪)		۲۹/۰۵	۲۱/۳۵	۱۷/۷۹	۱۳/۷۴	۲۷/۹۳	۲۶/۱۴

**، * و ns: به‌ترتیب معنی‌دار در سطوح احتمال ۱٪، ۵٪ و بدون اختلاف معنی‌دار



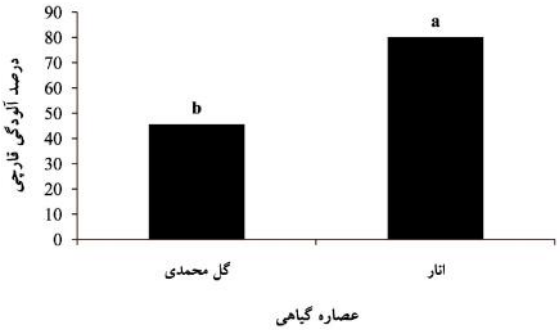
شکل ۱. تأثیر نانوذرات حاصله از دو نوع عصاره (پوست انار و گلبرگ‌های گل محمدی) بر میزان آلودگی باکتریایی کشت درون شیشه‌ای بنفشه آفریقایی پس از یک هفته. در هر ستون که حداقل در یک حرف مشترک باشند، تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد آزمون LSD ندارند.



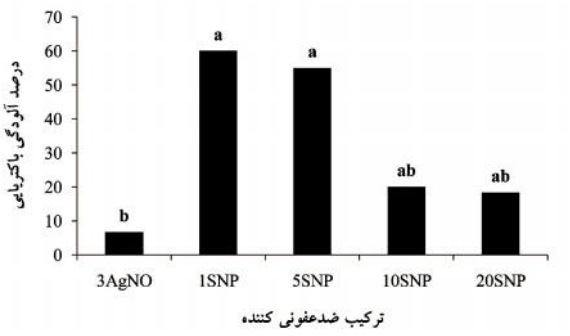
شکل ۲. تأثیر نانوذرات حاصله از دو نوع عصاره (انار و گل محمدی) بر میزان آلودگی باکتریایی کشت درون شیشه‌ای بنفشه آفریقایی پس از سه هفته. در هر ستون که حداقل در یک حرف مشترک باشند، تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد آزمون LSD ندارند.

توسط عصاره گلبرگ‌های گل محمدی در شکل ۴ آورده شده است که نشانگر این است که غلظت‌های ۱:۲۰ و ۱:۱۰ به‌خوبی توانسته‌اند آلودگی باکتریایی را کنترل نموده و در مقایسه با نیترات نقره معنی‌دار نشده‌اند. شکل ۵ نیز نشانگر این است که غلظت ۱:۲۰ به‌خوبی توانسته آلودگی قارچی را کنترل نموده و در مقایسه با نیترات نقره به‌عنوان شاهد معنی‌دار شده است (شکل‌های ۳، ۴ و ۵). در ضمن نتایج تجزیه واریانس پس از یک ماه نشان داد (جدول ۱) که فقط اثر نوع ترکیب گندزدایی‌کننده بر درصد باززایی و شاخساره‌زایی ریزنمونه‌ها در سطح ۵ درصد معنی‌دار شده است که نمودارهای آن در شکل‌های ۶ و ۷ نشان داده شده‌اند. مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف (ترکیب‌های ضد عفونی کننده) بر میزان باززایی ریزنمونه‌ها نشان می‌دهد که غلظت ۱:۲۰ (SNP20) از نظر آماری با شاهد و دیگر تیمارها تفاوت معنی‌دار داشته به‌نحوی که داری بیشترین درصد باززایی (۵۲ درصد) یک ماه پس از کشت بوده است (شکل ۸). در ضمن به‌دلیل آلودگی تیمارهای

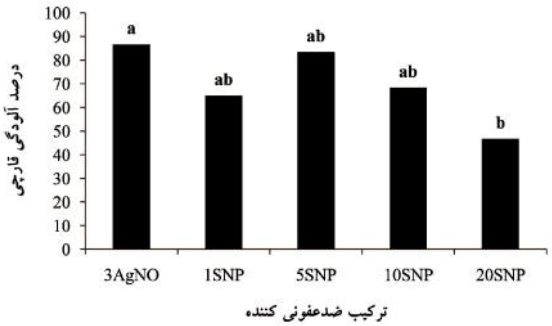
[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.22518517.1394.5.17.24.7]
[DOI: 10.18869/acadpub.jcpp.5.17.349]



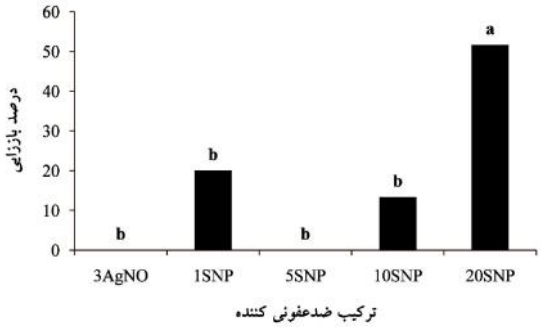
شکل ۳. تأثیر نانوذرات حاصله از دو نوع عصاره (انار و گل محمدی) بر میزان آلودگی قارچی کشت درون شیشه‌ای بنفشه آفریقایی پس از سه هفته. در هر ستون که حداقل در یک حرف مشترک باشند، تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد آزمون LSD ندارند.



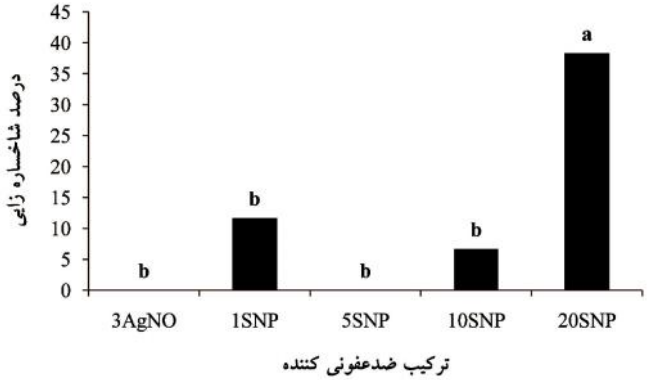
شکل ۴. تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات حاصله بر میزان آلودگی باکتریایی کشت درون شیشه‌ای بنفشه آفریقایی پس از سه هفته. در هر ستون که حداقل در یک حرف مشترک باشند، تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد آزمون LSD ندارند.



شکل ۵. تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات حاصله و نیترات نقره بر میزان آلودگی قارچی کشت درون شیشه‌ای بنفشه آفریقایی پس از سه هفته. در هر ستون که حداقل در یک حرف مشترک باشند، تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد آزمون LSD ندارند.

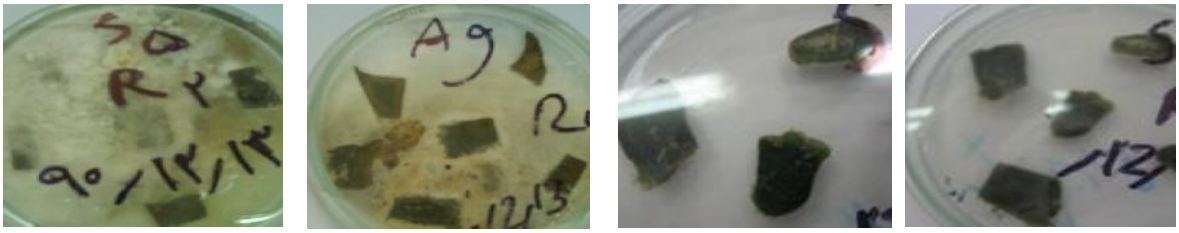


شکل ۶. تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات حاصله و نیترات نقره بر درصد باززایی ریز نمونه‌های بنفشه آفریقایی پس از یک ماه. در هر ستون که حداقل در یک حرف مشترک باشند، تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد آزمون LSD ندارند.



شکل ۷. تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات و نیترات نقره حاصله بر درصد شاخساره‌زایی ریزنمونه‌های بنفشه آفریقایی پس از یک ماه. در هر ستون که حداقل در یک حرف مشترک باشند، تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد آزمون LSD ندارند.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.22518517.1394.5.17.24.7]
[DOI: 10.18869/acadpub.jcpp.5.17.349]



(الف) (ب) (ج) (د)

شکل ۸. شروع باززایی ریزنمونه‌های بنفشه آفریقایی پس از سه هفته (الف) و تشکیل شاخساره‌ها پس از یک ماه (ب) تحت تیمار SNP20 در مقایسه با تیمارهای شاهد نیترات نقره (ج) و SNP5 (د)

نیترات نقره و SNP5 قبل از باززایی از بین رفتند، بنابراین هیچ‌گونه باززایی از خود نشان ندادند (شکل ۸). مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف (ترکیب‌های گندزدایی‌کننده) بر میزان شاخساره‌زایی ریز نمونه‌ها در شکل ۷ نیز نشانگر این است که غلظت SNP20 از نظر آماری با شاهد و دیگر تیمارها تفاوت معنی‌دار داشته به‌نحوی که داری بیشترین درصد میزان شاخساره‌زایی (۳۸ درصد) یک ماه پس از کشت بوده است (شکل ۸). در ضمن تیمارهای نیترات نقره و SNP5 که به‌دلیل هیچ‌گونه باززایی (شکل ۷) تولید هیچ شاخساره‌ای ننمودند (شکل ۸).

محیط‌های کشت درون شیشه‌ای به‌دلیل دارا بودن شرایط مناسب مانند منابع هیدرات کربن و وجود رطوبت و دمای مطلوب، مستعد بروز بسیاری از پاتوژن‌ها می‌باشند. آلودگی‌های باکتریایی و قارچی دو دسته از مهم‌ترین منابع آلودگی‌های درون شیشه‌ای می‌باشند که مواد گندزدای متنوعی از جمله الکل و هیپوکلرید سدیم برای کنترل آنها در شرایط درون شیشه‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرند (۲۳). ایده‌آل‌ترین ماده گندزدایی ترکیبی است که علاوه بر کارایی در مقابل اکثر پاتوژن‌ها در غلظت‌های کم، حداقل لطمه را به ریزنمونه‌ها وارد کند. امروزه مقاومت به باکتری‌ها و قارچ‌ها به مواد گندزدای متداول از عوامل محدود کننده استفاده این مواد در شرایط درون شیشه‌ای می‌باشد (۹).

مدتهاست که سمیت ترکیبات بر پایه نقره در مقابل بسیاری از میکروارگانیزم‌ها شناخته شده است و نشان داده شده است که اثر سمیت قوی روی بسیاری از سویه‌های باکتری دارند. هم‌چنین سطح ویژه نانوذرات نقره باعث فعالیت ضد میکروبی قوی می‌شود (۸، ۱۳ و ۲۰) که با نتایج این تحقیق مطابق بوده به‌طوری‌که در کنترل آلودگی‌های قارچی به‌ویژه در غلظت ۱:۲۰ میزان بروز آلودگی‌های قارچی در کشت‌ها نسبت به کاربرد نیترات نقره کارایی بهتری داشت. اگرچه پژوهش‌های محدودی در مورد کاربرد نانوذرات نقره در کشت‌های درون شیشه‌ای وجود دارد (۱ و ۱۵) اما مطالعات میکروبیولوژی زیادی در دسترس می‌باشد که خواص ضد میکروبی نانوذرات نقره را تأیید می‌نماید (۱۱، ۱۳، ۲۰ و ۲۱). پژوهشگران سازوکار خواص ضد میکروبی نانوذرات نقره را به واکنش قوی آنها با گروه‌های تیول (SH-) آنزیم‌ها و پروتئین‌های حیاتی و غیرفعال نمودن آنها، نفوذپذیری غشای سلول (Cell Membrane) و تخریب برخی متابولیسم‌ها مانند حمله به زنجیره تنفسی (Respiratory Chain)، اختلال در تقسیم DNA (به‌واسطه برهمکنش با گروه فسفر موجود در آن) و در نهایت مرگ سلول میکروارگانیزم‌ها مرتبط دانسته‌اند (۱۲ و ۱۴). نانوذرات نقره به‌دلیل دارا بودن سطح ویژه بزرگ‌تر نسبت به یون نقره دارای اثرات ضدمیکروبی شدیدتری می‌باشد که در این آزمایش نیز چنین نتیجه‌ای مشاهده گردید (شکل‌های ۴ و ۵).

بر اساس نتایج به‌دست آمده نانوذرات نقره حاصل از عصاره گلبرگ‌های گل محمدی در کنترل آلودگی‌های قارچی و باکتریایی ریزنمونه‌های درون شیشه‌ای بنفشه آفریقایی بهتر عمل نمود که به‌دلیل ایجاد نانوذراتی با شکل و اندازه مناسب برای

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.22518517.1394.5.17.24.7]
[DOI: 10.18869/acadpub.jcpp.5.17.349]

اثرات ضد میکروبی قوی می‌باشد. در این آزمایش غلظت‌های کمتر نانوذرات نقره به‌ویژه ۱:۲۰ عملکرد بهتری برای کنترل آلودگی‌های ریزنمونه بنفشه آفریقایی داشتند. از آنجایی که مؤثر بودن نانوذرات بستگی به اندازه و غلظت به‌کار گرفته شده آنها دارد (۱۶ و ۱۷) از این رو نانوذرات تشکیل شده در سایر غلظت‌ها (مانند ۱:۱) دارای اندازه و شکل مناسب برای عملکرد آنتی میکروبی مناسب در شرایط درون شیشه‌ای نبوده است. در این تحقیق هیچ‌کدام از غلظت‌ها موجب آسیب به ریزنمونه‌ها نشدند درحالی‌که نتایج سایر مطالعات نشان می‌دهد که با افزایش غلظت ماده ضدعفونی کننده به‌دلیل تماس بیشتر اثرات سمیت بیشتری هم روی سلول میکروارگانیزم‌ها و حتی ریزنمونه‌های گیاهی مشاهده شده که نتایج این آزمایش با نتایج برخی پژوهشگران بر روی گیاه سنبل الطیب (۱) و برخی دیگر مبنی بر کاربرد نانوذرات نقره برای گندزدایی ریزنمونه‌های درون شیشه‌ای زیتون مغایرت داشت (۱۵). به‌نظر می‌رسد این اختلاف در نتایج به‌دلایلی هم‌چون نوع گیاه و یا نوع ریزنمونه و منبع نانوذرات نقره به‌کار گرفته شده (شیمیایی و یا بیولوژیکی) باشد.

نکته قابل توجه در این تحقیق باززایی و شاخساره‌زایی خوب ریزنمونه‌های درون شیشه‌ای بنفشه آفریقایی گندزدایی شده با نانوذرات نقره به‌ویژه در غلظت ۱:۲۰ بود که بیشترین میزان باززایی ریزنمونه‌ها را داشت (شکل‌های ۶ و ۷). این نتیجه نیز با یافته‌های برخی پژوهشگران مشابهت داشت که آنها ذکر کردند نانوذرات نقره اثر منفی در رشد ریزنمونه‌های درون شیشه‌ای سنبل‌الطیب نداشت (۵). البته عدم تأثیر منفی در رشد ریزنمونه‌های درون شیشه‌ای را می‌توان به‌دلیل اثرات غیرمستقیم در کنترل بیشتر آلودگی‌ها و در نتیجه امکان رشد و باززایی بهتر ریزنمونه‌های بنفشه آفریقایی می‌باشد (۱۷ و ۲۲).

نتیجه‌گیری

به‌طورکلی براساس نتایج این تحقیق نانوذرات نقره به‌ویژه غلظت‌های کم آن همانند ۱:۲۰ حاصل شده از عصاره گلبرگ‌های گل محمدی در مقایسه با عصاره پوست انار توانایی مناسبی در کنترل آلودگی‌های قارچی و باکتریایی و در نهایت بالاترین میزان باززایی و شاخساره‌زایی ریزنمونه‌های بنفشه آفریقایی داشتند و می‌توانند به‌عنوان جایگزین مناسبی برای ترکیبات گندزدای معمول باشند.

سپاسگزاری

این تحقیق به‌عنوان بخشی از طرح پژوهشی به شماره ۸۹/۱۰۲۲۱ مورخ ۱۳۸۹/۹/۲۱ معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه اراک می‌باشد که بدین وسیله از همکاری ایشان تقدیر و تشکر می‌گردد.

منابع مورد استفاده

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 Physiologiae Plantarum* 30: 709-714.
2. Dole, J. M. and H. F. Wilkins. 1999. Floiculture: Principles and Species. Prentice Hall Publication. Washington. USA.
3. Dubey, S. P., M. Lahtinen and E. Sillanpaa. 2010. Green synthesis and characterizations of silver and gold nanoparticles using leaf extract of *Rosa rugosa. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 364: 34-41.
4. 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:* Procceding of the 7th Iranian Horticultural Congress. Esfahan, Iran. pp. 79. (In Farsi).
5. Khalighi, A. 1999. Floriculture. Rooz Bahan. Tehran. (In Farsi).
6. 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.
7. Kim, J. H., A. K. Lee and J. K. Suh. 2005. Effect of certain pre-treatment substances on vase life and physiological

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.22518517.1394.5.17.24.7]
[DOI: 10.18869/acadpub.jcpp.5.17.349]

characters in Lilium spp. *Acta Horticulture* 673: 307–314.
8. Kim, J. S., E. Kuk, K. N. Yu, J. Kim, S. J. Park, H. J. Lee, S. H. Kim, Y. K. Park, Y. H. Park, C. Y. Hwany, Y. K. Kim, S. Y Lee, D. H. Jeong and M. H. Cho. 2007. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 3: 95-101.
9. Kumar, U. 2001. Methods in Plant Tissue Culture. Agrobios, India.
10. Liu, J., K. Ratnayake, D. C. Joyce, S. He and Z. Zhang. 2012. Effects of three different nano-silver formulations on cut Acacia holosericea vase life. *Postharvest Biology and Technology* 66: 8–15.
11. Maneerung, T., S. Tokura and R. Rujiravant. 2008. Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing. *Carbohydrate Polymers* 72: 43–51.
12. Morrones, J. R., J. L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J. Kouri, J. T. Ramirez and M. J. Yacamoo. 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 16: 2346-2353.
13. Navarro, E., A. Baun, R. Behra, N. B. Hartman, J. Filser, A. J. Miao, A. Quiagg, P. H. Santschi and L. Sigg. 2008. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nonoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology* 17: 372-386.
14. Rai, M., A. Yadav and A. Gade. 2009. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances* 27: 76–83.
15. Rostami, A. A. and A. Shahsavar. 2009. nano-Silver Particles eliminate the *in vitro* contamination of olive 'mission' explants. *Asian Journal of Plant Sciences* 8: 505-509.
16. Solgi, M. and M. Taghizadeh. 2012. Silver nanoparticles ecofriendly synthesis by two medicinal plants. *International Journal of Nanomaterials and Biostructurs* 2(4): 60-64.
17. Solgi, M. and M. Taghizadeh. 2012. Silver nanoparticles green synthesis by Rosa damascene petals. *In:* Proceeding of the 2nd National Congress on Chemistry Applications in New Technologies. Esfahan, Iran. pp. 136.137. (In Farsi).
18. Solgi, M. and M. Taghizadeh. 2013. Regeneration and shoot regeneration of African violet explants using green produced silver nanoparticles by plants. *In:* Proceeding of 8th Iranian Horticultural Sciences Congress. Hamedan, Iran. pp. 1048-1052.
19. Solgi, M., M. Kafi, T. S. Taghavi and R. Naderi. 2009. Essential oils and silver nanoparticles (SNP) as novel agents to extend vase life of gerbera (*Gerbera jamesonii* cv. 'Dune') flowers. *Postharvest Biology and Technology* 53: 155–158.
20. 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.
21. Song, H. Y. K. K. Ko and B. T. Lee. 2006. Fabrication of silver nanoparticles and their antimicrobial mechanisms. *European Cell and Materials* 11: 58.
22. Taghizadeh, M., N. Entekhab and M. Kafi. 2004. Evaluation of Factors in Micropropagation of African violet in *in vitro*. *In:* Proceeding of the 5th Iranian Horticultural Congress. Shiraz, Iran. pp. 280-281. (In Farsi).
23. Torres, K. T. 1989. Tissue Culture Techniques for Horticultural Crops. Published by Van Nostrand Reinhold, New Yourk.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.22518517.1394.5.17.24.7]
[DOI: 10.18869/acadpub.jcpp.5.17.349]