

تأثیر نانونقره بر آلودگی باکتریایی و شاخص‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی بادام GN15 کشت بافتی

الناز حاتمی^۱، علی اکبر شکوهیان^{۲*}، علیرضا قنبری^۲ و لطفعلی ناصری^۳

۱ و ۲. دانشجوی سابق دکتری و دانشیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

۳. دانشیار، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۸/۱۵ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۲۲)

چکیده

نانوتکنولوژی توانسته راهگشای روش‌های نوینی در علوم گیاهی و تحقیقات کشاورزی باشد. این تحقیق به منظور بررسی اثرات نانونقره در ۴ غلظت (صفر (شاهد)، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) و ۸ تکرار، در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی، بر درصد زنده‌مانی، آلودگی باکتریایی و شاخص‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی ریزنمونه‌های بادام GN15، در دانشگاه ارومیه، اجرا شد. جوانه انتهایی بادام رشد یافته در محیط کشت MS حاوی ۳ درصد ساکاروز و ۰/۸ درصد آگار، در محیط مشابه، حاوی غلظت‌های مختلف نانونقره و ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP، واکشت و در اتاقک رشد قرار داده شدند. با افزایش غلظت نانونقره، درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌ها افزایش و آلودگی باکتریایی و قارچی کاهش یافتند. نانونقره در غلظت‌های صفر تا ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، باعث افزایش طول ریشه، تعداد برگ، میزان کلروفیل a، b، کلروفیل کل، کارتنوئید و کربوهیدرات‌های محلول برگ و در غلظت‌های بالاتر، موجب کاهش این فاکتورها شد. افزایش غلظت نانونقره باعث کاهش طول ساقه و تعداد ساقه شد، اما روی تعداد ریشه تأثیر معنی‌داری نداشت. با وجود تأثیر افزایش غلظت نانونقره در کاهش آلودگی باکتریایی، تا سطح ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، حتی تا کمتر از ۱۰ درصد، بهترین سطح، در جهت بهبود ویژگی‌های رویشی و بیوشیمیایی ریزنمونه‌های GN15، تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بود.

واژه‌های کلیدی: آلودگی، طول ریشه، کارتنوئید، کلروفیل، نانوتکنولوژی.

Effects of Nano silver on bacterial contamination and morphological and biochemical indices of in vitro GN15 almond rootstock

Elnaz Hatami¹, Ali Akbar Shokoohian^{2*}, Alireza Ghanbari² and Lotfali Naseri³

1, 2. Former Ph.D. Student and Associate Professor, Faculty of Agriculture, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

3. Associate Professor, Faculty of agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

(Received: Nov. 6, 2017 - Accepted: Mar. 13, 2018)

ABSTRACT

Nanotechnology has been able to pave the way for new methods in plant sciences and agricultural research. This research was carried out to investigate effects of Nano silver in 4 concentrations (0 (control), 100, 150 and 200 mg L⁻¹) at 8 replications in a complete randomized block design, on viability, bacterial contamination and some morphological and biochemical indices of GN15 explants at Urmia University. Shoot tip of cultivated GN15 rootstock were placed in MS medium containing 3% sucrose and 0.8% agar and different concentrations of Nano silver and 1 mg L⁻¹ BAP. Samples were recultured and were grown in growth chamber. By increasing Nano silver concentration, the plants survival increased and the percentage of bacterial and fungal contamination decreased. Nano silver increased the root length, leaf number, chlorophyll a, b, total chlorophyll, carotenoids and soluble carbohydrates at concentrations from 0 to 100 mg L⁻¹. At higher concentrations, these factors were decreased. Increasing the concentration of Nano silver decreased the shoot number and lateral branches number of explants, but did not have a significant effect on root number. Despite the effect of increasing the concentration of Nano silver on reducing bacterial contamination, up to 200 mg L⁻¹, even to less than 10%, the best level, improving the biotic properties of GN15 explants was 100 mg L⁻¹.

Keywords: Carotenoid, chlorophyll, contamination, nanotechnology, root length.

* Corresponding author E-mail: shokouhiana@yahoo.com

مقدمه

ویژگی‌های منحصر به فرد این مواد، نظیر نسبت سطح به حجم بالا، توانایی انتقال الکترون و قابلیت‌های واکنش‌های سطحی بالا، گسترش داده است (Scriniis & Lyons, 2007). این ذرات بسیار ریز به دلیل داشتن سطح بسیار وسیع و در نتیجه افزایش چسبندگی، تماس بهتری با میکروارگانیسم‌ها برقرار کرده و باعث مقابله با آلودگی‌های محیط کشت بافت گیاهی می‌شوند (Ghasemi Pirbaloti, 2010; Safavi, 2014). نانوذرات نقره، با آزادسازی آرام یون‌های مثبت نقره، باعث تخریب فسفولیپیدهای غشای سلولی باکتری‌ها می‌شوند (Dibrov *et al.*, 2002; Vankar & Shulka, 2012) و ممانعت از همانندسازی DNA شده (Taghizadeh & Solghi, 2014) و ساختار سلولی میکروارگانیسم‌ها را از بین می‌برد (Lubick, 2008). نانونقره از یک طرف می‌تواند با از بین بردن میکروارگانیسم‌های مضر ریزنمونه را نجات دهد و از طرفی در غلظت بالا، با تولید گونه‌های اکسیژن فعال و تأثیر بر مواد ژنتیکی، باعث بروز ناهنجاری در بافت‌های گیاهی گردد (Chen *et al.*, 2012; Arifa *et al.*, 2012; Schlusener, 2008). لذا، کاربرد غلظت و مدت زمان مناسب این نانوذرات، می‌تواند ابزاری سودمند برای رفع آلودگی بافت‌های گیاهی باشد (Mahna *et al.*, 2013). در سال‌های اخیر دانشمندان بسیاری اثرات مواد نانو را روی جوانه‌زنی و رشد گیاه مطالعه نموده‌اند (Hatami & Ghorbanpour, 2014). کاربرد پیش‌تیمار نانو نقره روی پیازهای زعفران، با جلوگیری از فعالیت اتیلن، موجب افزایش تولید ریشه، رشد طولی گیاهچه و جلوگیری از پوسیدگی قارچی و باکتریایی پیازهای زعفران و در نهایت افزایش مقاومت به تنش غرقابی شد (Rezvani *et al.*, 2012; Rezvani & Sorooshzadeh, 2014). افزایش غلظت نانونقره، با وجود کاهش رشد باکتری‌ها در محیط کشت، باعث کاهش درصد جوانه‌زنی بذور آرابیدوپسیس، کاهش زنده‌مانی کوتیلدون‌های گوجه‌فرنگی و ریزنمونه‌های برگی سیب‌زمینی شد و این امر به سمیت این ترکیب برای سلول‌های یوکاریوتی مربوط شد (Mahna *et al.*, 2013). این پژوهش، با هدف ارائه اطلاعاتی در مورد تأثیر نانونقره بر میزان آلودگی باکتریایی و قارچی، زنده‌مانی

بادام با نام علمی *Prunus dulcis* Mill. و متعلق به خانواده *Rosaceae*. قرابت ژنتیکی بالایی با هلو دارد که باعث به‌وجود آمدن پایه‌های هیبرید طبیعی شده است (Fideghelli *et al.*, 1998). پایه رویشی GN15 یا Garnem با منشأ کشور اسپانیا، یکی از کلون‌های جدید حاصل از تلاقی بادام Garfi و هلوی Nemared است که دارای قدرت رشد بالا، تحمل به نماتد گره ریشه و سازگاری به خاک‌های آهکی می‌باشد (Leifert & Casselles, 2001). در دهه‌های اخیر که سطح زیر کشت بادام در برخی از کشورها از طریق کشت بافت افزایش یافته است (Amirghasemi, 2004)، استقرار و حفظ یک کشت استریل، چالش برانگیزترین مرحله این فرآیند می‌باشد (Rostami & Shahsavari, 2009; Taghizadeh & Solghi, 2014). یکی از مشکلات کشت بافت تک‌گره در پایه GN15، کنترل آلودگی باکتریایی است (Nazarimoghdam Aghayi *et al.*, 2013). باکتری‌ها و قارچ‌ها به دلیل جذب بیشتر منابع هیدروکربنی از محیط کشت بافت (Sondi & Salopek-Sondi, 2004)، سریع‌تر از سلول‌های گیاه رشد کرده و از باززایی آن جلوگیری می‌کنند (Casselle, 1991). روش‌های مختلفی برای کنترل آلودگی‌های محیط کشت بافت از جمله کشت مریستم، تکرار واکشت (Mahna *et al.*, 2013) و کاربرد آنتی‌بیوتیک‌ها (Abdi *et al.*, 2008) وجود دارد. ترکیبات آنتی‌بیوتیک، گران، حساس به گرما و سمی بوده و روی رشد، باززایی، القای کالوس و زنده‌مانی ریزنمونه اثر محدودکننده دارند و به محض حذف از محیط کشت، مجدداً آلودگی ظاهر شده (Taghizadeh & Solghi, 2014) و قرار گرفتن طولانی سلول‌های گیاهی در مجاورت آنها، باعث بروز جهش می‌شود (Bhojwani & Razdan, 1996). لذا یافتن یک ماده مؤثر، کم‌هزینه، در دسترس و ایمن برای حذف آلودگی ریزنمونه‌ها بسیار مهم است (Rostami & Shahsavari, 2009; Taghizadeh & Solghi, 2014). پیشرفت نانوتکنولوژی در فیزیولوژی و بیوشیمی، حیطه کاربرد مواد نانو در زمینه‌های مختلف را به دلیل

و قارچی بعد از ۴ هفته، ثبت شد. شاخص زنده‌مانی از طریق محاسبه درصد گیاهان بازایی شده فاقد آلودگی نسبت به کل گیاهان به‌دست آمد. درصد گیاهان آلوده نیز با شمارش تعداد گیاهان آلوده به باکتری یا قارچ سنجش شد. بعد از آن، هر ماه یک‌بار عمل واکشت و انتقال به محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف نانوقره، انجام شد و درنهایت بعد از ۵ ماه، فاکتورهای موفولوژیکی، نظیر طول و تعداد ریشه، طول و تعداد ساقه و تعداد برگ اندازه‌گیری شدند. برای سنجش فاکتورهای بیوشیمیایی گیاهچه‌های رشدیافته در این محیط کشت نیز به‌روش‌های ذیل عمل شد. در سنجش میزان کلروفیل، بعد از عصاره‌گیری ۰/۱ گرم از برگ هر ریزنمونه توسط ۵ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد، میزان جذب محلول رویی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل UV Vis 2100 UV-Unico, USA در طول موج‌های ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر (برای کلروفیل a، b و کل) و در طول موج ۴۷۰ نانومتر برای کارتنوئیدها قرائت گردید و غلظت آنها با استفاده از روابط زیر محاسبه و برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر ارائه شد (Arnon, 1967).

$$\text{Chl a} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) = (12.7 \times \text{OD663} - 2.69 \times \text{OD645}) \quad (1)$$

$$\text{Chl b} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) = 22.9 \times \text{OD645} - 4.68 \times \text{OD663} \quad (2)$$

$$\text{Chl}_{\text{total}} (\text{mg/ml}) = \text{Chl}_a + \text{Chl}_b \quad (3)$$

$$\text{Car} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) = (1000 \times \text{OD470} - 1.8 \text{Chl a} - 85.02 \times \text{Chl b}) / 19 \quad (4)$$

در اندازه‌گیری کربوهیدرات‌های محلول برگ، بعد از عصاره‌گیری ۰/۱ گرم برگ به‌همراه ۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد و سانتیفریژ کردن، ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره در لوله آزمایش ریخته شد و بعد از افزودن ۳ میلی‌لیتر آنترون و قرار دادن در حمام آب جوش، میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۲۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید (Irigoyen et al., 1992).

شاخص‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی ریزنمونه‌های پایه هیبرید GN15 در شرایط درون‌شیشه به اجرا درآمد.

مواد و روش‌ها

تهیه محیط کشت

جوانه‌های انتهایی ۳-۲ میلی‌متری از ریزنمونه‌های پایه‌های بادام GN15 دارای آلودگی داخلی، که قبلاً در شرکت تولید نهال اروم زیست تاک، واقع در ۱۵ کیلومتری جاده ارومیه-سلماس، در محیط کشت موراشیک-اسکوگ (MS) کشت شده بودند، جدا شده و در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف نانوقره (صفر (شاهد)، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر)، به‌همراه ۱ میلی‌گرم بر لیتر هورمون بنزیل آمینوپورین (BAP)، ۳۰ گرم بر لیتر ساکاروز (۳ درصد) و ۸ گرم بر لیتر آگار (۰/۸ درصد) واکشت گردیدند. بعد از تنظیم pH محیط کشت، روی ۵/۸، توسط اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال، شیشه‌های حاوی محیط کشت، به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۵ کیلوگرم بر سانتی‌متر، اتوکلاو شدند. بعد از کشت ریزنمونه‌های گیاهی، شیشه‌ها در اتاقک رشد، زیر نور لامپ فلورسنت با شدت نور ۲۵۰۰-۳۰۰۰ لوکس، فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند (Abdi, 2012; Daryani et al., 2015). نانوقره مورد استفاده، تولید سیگما آلدریج کشور آمریکا، با قطر ذرات کمتر از ۱۵۰ نانومتر و وزن مولکولی ۱۰۷/۸۷ گرم، به سفارش شرکت اروم طب ارومیه، از تهران، تهیه شد. برای تهیه محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره، از آنجایی‌که این ذرات مقاوم به حرارت و نامحلول در تمام حلال‌ها می‌باشد، لذا برای تهیه سوسپانسیون MS حاوی نانوذرات نقره، بعد از تهیه محیط کشت و افزودن نانوقره، محیط کشت روی شیکر قرار گرفت تا همزمان با سرد شدن آرام، نانوذرات نقره به‌طور یکنواخت در آن توزیع گردند (Abdi, 2012).

اندازه‌گیری شاخص‌های مورد آزمایش

درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌ها و درصد آلودگی باکتریایی

بیشترین درصد آلودگی باکتریایی و قارچی مربوط به تیمار شاهد و کمترین میزان این دو فاکتور مربوط به تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بود. بین دو تیمار ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانونقره از لحاظ درصد آلودگی باکتریایی تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد. در غلظت‌های بالاتر، با وجود کاهش درصد آلودگی قارچی، درصد آلودگی باکتریایی و درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌ها تغییری نکرد و افزایش غلظت نانونقره بر بهبود وضعیت ریزنمونه‌های گیاهی تأثیری نداشت. نانونقره بر کاهش درصد آلودگی باکتریایی بیشتر از درصد آلودگی قارچی مؤثر بود (شکل ۱).

یون‌های نقره با واکنش با گروه‌های سولفیدریل غشای سلولی و جایگزین شدن با گوگرد و خسارت وارد کردن به پوشش‌های سلولی، واکنش با ترکیبات فسفردار نظیر اسیدهای نوکلئیک و جلوگیری از تقسیم سلول‌ها، افزایش نشت پروتون‌ها و یون‌های پتاسیم و ممانعت از فرآیندهای زنجیره تنفسی، باعث مرگ سلول شده و خاصیت ضدباکتریایی خود را ایفا می‌کنند (Dibrov *et al.*, 2002; Sondi & Salopek-Sondi, 2004; Felipe, 2009). نتایج مشابهی در تحقیق روی کشت بافت ریزنمونه‌های رز (Shokri *et al.*, 2014) به‌دست آمد.

طرح آزمایشی و تجزیه داده‌ها

این پژوهش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۴ غلظت نانونقره و در ۸ تکرار بررسی شد. داده‌های حاصل با نرم‌افزار SAS (Version 9.2) تجزیه و تحلیل شدند و رسم نمودارها توسط نرم‌افزار اکسل انجام شد. برای مقایسه میانگین داده‌های صفات مور آزمایش از آزمون توکی در سطح احتمال ۵٪ استفاده شد.

نتایج و بحث

تأثیر غلظت‌های مختلف نانونقره بر درصد زنده‌مانی،

آلودگی باکتریایی و قارچی ریزنمونه‌های GN15

نتایج جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که بین تیمارهای نانونقره از لحاظ تأثیر بر درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌ها، درصد آلودگی باکتریایی و درصد آلودگی قارچی در سطح احتمال ۱ درصد تفاوت معنی‌داری وجود داشت.

با افزایش غلظت نانونقره، درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌ها افزایش و درصد آلودگی باکتریایی و قارچی کاهش یافت. بیشترین درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌ها مربوط به تیمار ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بود که اختلاف معنی‌داری بین این دو تیمار مشاهده نشد.

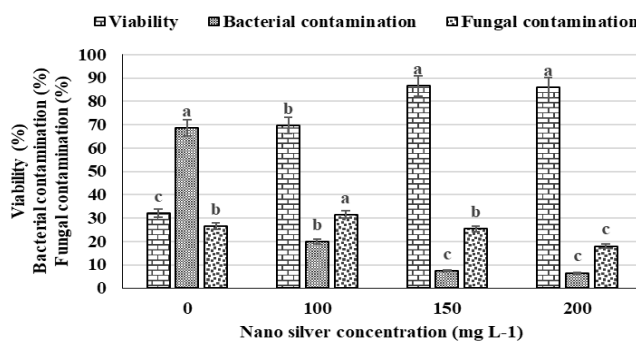
جدول ۱. تجزیه واریانس اثرات غلظت‌های مختلف نانونقره بر درصد زنده‌مانی، آلودگی باکتریایی و قارچی ریزنمونه‌های GN15

Table 1. Analysis of variance of different concentrations of Nano silver (NS) effects on the plant survival, bacterial and fungal contamination percent of GN15 explants

S.O.V	df	Plant survival	Bacterial contamination	Fungal contamination
Block	7	12.33 ^{ns}	1.62 ^{ns}	5.30 ^{ns}
Ns	3	7290.32 ^{**}	1384.13 ^{**}	3966.10 ^{**}
Error	21	11.60	4.27	6.21
CV (%)	-	4.75	4.61	12.66

ns و **: نبود اختلاف معنی‌دار و اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

ns, **: non-significant and significant at the 1% of probability level, respectively.



شکل ۱. درصد زنده‌مانی، آلودگی باکتریایی و قارچی ریزنمونه‌های GN15 تحت تأثیر غلظت‌های مختلف نانونقره.

(حروف مشابه در ستون‌ها نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین آنها در سطح احتمال ۱ درصد می‌باشد.)

Figure 1. The survival, bacterial and fungal contamination percent of GN15 explants under different concentrations of nano-silver. (Similar letters in the labels indicate that there is no significant difference between them at the 1% probability level.)

این گیاه شد؛ که این نتیجه با نتایج تحقیقات انجام گرفته روی بذر ریحان همخوانی داشت (Yusefzaiy *et al.*, 2015). در این تحقیق معلوم شد که کاربرد تیمار ۰ تا ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو نقره، در شرایط کشت خاکی، باعث افزایش طول اندام هوایی، طول ریشه و وزن تر و خشک ریشه و برگ تا سطح ۵ پی‌پی‌ام و کاهش بعدی این فاکتورها در سطوح بالاتر شد. افزایش غلظت نانو نقره از ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر به بالا، رشد ریشه و تولید کالوس را در بذور آراییدوپسیس و کلم کاهش داد (Soltanloo *et al.*, 2010).

آسیب‌دیدن سلول‌های کلاهک ریشه در گیاه *Lolium multiflorum* عامل کاهش رشد ریشه در این گیاه معرفی شد (Yin *et al.*, 2011). اعمال غلظت‌های صفر تا ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو نقره، روی بذر گیاه دارویی رازیانه، در شرایط تنش شوری، باعث افزایش درصد جوانه‌زنی، وزن تر و خشک گیاهچه، طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه تا سطح ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر و کاهش بعدی این فاکتورها در سطوح بالاتر شد (Ekhtiari *et al.*, 2008). استفاده از نانوذرات نقره تا سطح ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر باعث افزایش انرژی رویشی، طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه، تعداد برگ و وزن خشک و تر در گیاه آویشن کوهی (Aghajani *et al.*, 2014) و گیاه *Trigonella foenumgraecum* (Jasim *et al.*, 2017) شد. (2009) اعلام کردند که تیمار نانوذرات نقره، با افزایش قدرت جذب آب توسط دانه، باعث افزایش جوانه‌زنی بذور گوجه‌فرنگی می‌شود. کاربرد همین ترکیب در محیط کشت بافت گیاه وانیل نیز باعث افزایش ریشه‌دهی و تکثیر ساقه آن شد (Gridhar *et al.*, 2003).

در غلظت‌های بالاتر از ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانو نقره میزان آلودگی در کشت درون‌شیشه‌ای جوانه‌های انتهایی و جانبی فندق حتی تا ۱۰۰ درصد کاهش یافت اما باعث آسیب به ریزنمونه‌ها شد (Daryani *et al.*, 2015). در پیش‌تیمار قلمه‌های زیتون با غلظت‌های مختلف نانو نقره، با وجود کنترل آلودگی، خسارت شدید به ریزنمونه‌ها وارد شد و باعث قهوه‌ای شدن آنها گردید. افزودن همین ترکیب به محیط کشت، علاوه بر داشتن اثرات از بین‌برنده آلودگی، اثرات منفی روی رشد ریزنمونه‌ها نداشت. ضدعفونی سطحی ریزنمونه‌های اسطوخودوس و غوطه‌ورسازی در محلول ۱۰۰ پی‌پی‌ام نانو نقره برای ۶۰ دقیقه، بدون هیچ‌گونه اثر منفی روی ویژگی‌های رشدی گیاه، باعث رفع آلودگی درونی ریزنمونه‌ها شد (Abdi *et al.*, 2008).

تأثیر غلظت‌های مختلف نانو نقره بر شاخص‌های مورفولوژیکی ریزنمونه‌های GN15

بین تیمارهای نانو نقره از لحاظ تأثیر بر طول ریشه، طول ساقه، تعداد ساقه و تعداد برگ در سطح احتمال ۱ درصد تفاوت معنی‌داری وجود داشت؛ اما از لحاظ تعداد ریشه، بین تیمارها، تفاوت آماری معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۲). با افزایش غلظت نانو نقره، طول ساقه و تعداد ساقه کاهش پیدا کرد، به‌طوری‌که بیشترین میزان این شاخص‌ها مربوط به تیمار شاهد و کمترین مربوط به تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بود. شاخص‌های طول ریشه و تعداد برگ نیز با افزایش غلظت نانو نقره، تا سطح ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، افزایش و سپس کاهش پیدا کردند (شکل ۲-A, B).

مطالعه علائم ظاهری ریزنمونه‌های پایه GN15 نشان داد که افزایش غلظت نانو نقره باعث کاهش رشد

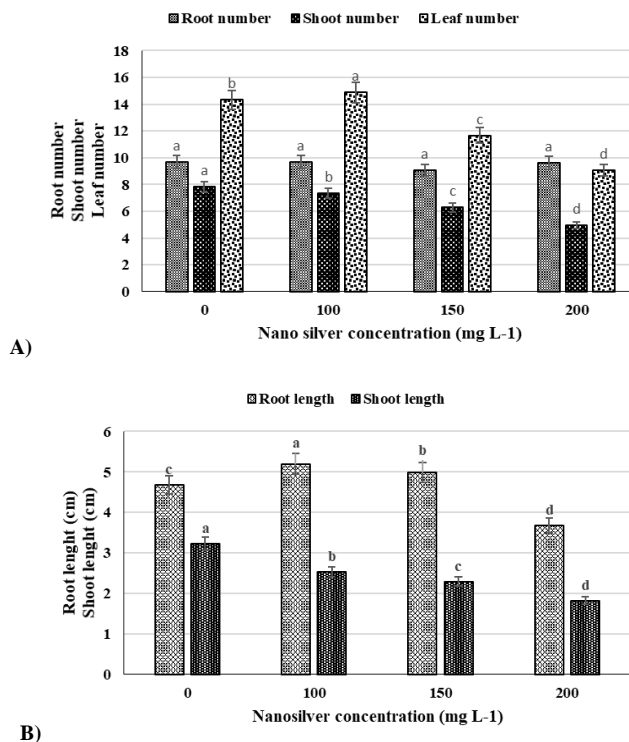
جدول ۲. تجزیه واریانس اثرات غلظت‌های مختلف نانو نقره بر ویژگی‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی ریزنمونه‌های GN15

Table 2. Analysis of variance of different concentrations of nano-silver (NS) effects on the morphological and biochemical properties of GN15 explants

S.O.V	df	Root length	Root number	Shoot length	Shoot number	Leaf number	Chl a	Chl b	Chl T	Carotenoid	Leaf soluble carbohydrates
Block	7	0.01280 ^{ns}	0.47782 ^{ns}	0.00219 ^{ns}	0.00990 ^{ns}	0.94973 ^{ns}	0.00336 ^{ns}	0.04761 ^{ns}	0.04344 ^{ns}	0.00049 ^{ns}	0.00802 ^{ns}
Ns	3	3.53 ^{**}	0.63 ^{ns}	2.75 ^{**}	13.06 ^{**}	57.02 ^{**}	2.74 [*]	18.63 ^{**}	35.13 ^{**}	1.09 ^{**}	34.53 ^{**}
Error	21	0.083	0.572	0.001	0.007	0.950	0.002	0.043	0.045	0.002	0.008
C.V. (%)	-	1.81	5.92	1.33	1.27	4.79	2.32	2.94	2.29	3.29	4.89

ns, *, **: non-significant and significant at the 5% and 1% of probability level, respectively.

ns, *, **: non-significant and significant at the 5% and 1% of probability level, respectively.



شکل ۲. A) طول ریشه و ساقه و ریز نمونه‌های GN15 تحت تأثیر غلظت‌های مختلف نانونقره. B) تعداد ریشه، ساقه و برگ ریز نمونه‌های GN15 تحت تأثیر غلظت‌های مختلف نانونقره.

Figure 2. A) Root and stem length of GN15 explants under different concentrations of Nano silver. B) Root, stem and leaf number of GN15 explants under different concentrations of Nano silver.

ریشه در غلظت‌های بالا شد و طول‌شدگی سلول‌ها در اثر یون نقره کاهش یافت. البته علی‌رغم افزایش میزان هورمون اسید جیبرلیک در این آزمایش، عدم انتقال هورمون اسید جیبریک از برگ به ساقه، عدم تجزیه و مصرف این هورمون و یا عدم تبدیل فرم پیوسته این هورمون به فرم آزاد و فعال، می‌تواند دلایلی بر کاهش رشد طولی ساقه باشند (Ehsanpour & Nejati, 2013). یون‌های نقره آزاد شده از نیترات‌نقره، به دلیل تأثیر این ماده در جلوگیری از فعالیت اتیلن، باعث تولید شاخه‌های قوی تیره‌تر، طول شاخه کم، تعداد ریشه کم با طول بیشتر در سیب‌زمینی کشت بافتی شد (Turhan, 2004).

تأثیر غلظت‌های مختلف نانونقره بر شاخص‌های بیوشیمیایی ریزنمونه‌های GN15

تجزیه واریانس داده‌ها بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار، بین تیمارهای نانونقره، از لحاظ تأثیر بر میزان کربوهیدرات‌های محلول برگ و کلروفیل a، b،

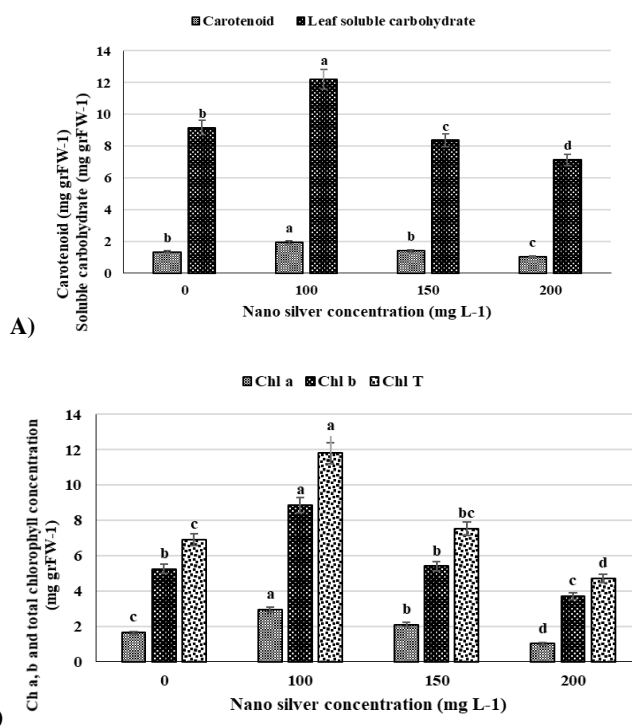
نانونقره از طریق دو مکانیسم احتمالی باعث کاهش فعالیت اتیلن می‌شود: ۱) یا با همان ساختار وارد سلول شده و به عنوان پوششی روی گیرنده‌های اتیلن، آنها را غیرفعال می‌کند، ۲) یا در اثر عمل اکسایش به یون نقره تبدیل شده و با جایگزینی نقره با یون مس در گیرنده اتیلن، فعالیت آن را می‌کاهد (Ehsanpour & Nejati, 2013). اتیلن باعث جلوگیری از تقسیم و تمایزبایی سلول‌ها می‌شود (Perl *et al.*, 1988). افزایش غلظت نانونقره، در محیط کشت گیاه *Tocomella undulata*، با جلوگیری از فعالیت اتیلن، باعث افزایش زنده‌مانی، طول ساقه و تعداد ساقه و کاهش قطر کالوس در این گیاه شد (Aghdaei *et al.*, 2012). تجمع اتیلن در اثر تنفس ریزنمونه سیب‌زمینی، رقم وایت‌دزیره، در محیط در بسته باعث تولید ریشه‌های هوایی، شاخه‌های بی‌کیفیت و برگ‌های کوچک شد. تیمار این گیاهان توسط نانونقره با ممانعت از فعالیت اتیلن، موجب افزایش سطح برگ، کاهش طول ساقه و فاصله میانگره‌ها و کاهش طول

نانوذرات نقره در گیاه جو باعث افزایش محتوای پروکلین، به‌عنوان یک ماده آنتی‌اکسیدان، در این گیاه شد (Nowroozi *et al.*, 2016). افزایش این ترکیب آمینی در اثر تیمار نانونقره باعث شود که گلوتامین، به‌عنوان پیش‌ماده مشترک سنتز کلروفیل و پروکلین، کمتر در مسیر بیوسنتز کلروفیل شرکت داشته باشد (Mahajan & Tuteja, 2005)، که می‌تواند فرضیه‌ای مبنی بر کاهش سنتز کلروفیل در گیاهان تیمار شده با نانونقره باشد. کارتنوئیدها ترکیبات تتراترپنی هستند که وظیفه آنها حفاظت از کلروفیل در برابر اکسیداسیون نوری بوده و با حذف رادیکال‌های اکسیژن فعال، نقش آنتی‌اکسیدانی ایفا می‌کنند (Delvin & Whitman, 2002).

میزان کلروفیل a, b، کل و کارتنوئید موجود در برگ گیاه کلزای کشت بافتی، در اثر افزایش غلظت نانونقره، تا سطح ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر افزایش حدود ۳۵ درصدی نسبت به تیمار شاهد داشت که با افزایش غلظت نانونقره، کاهش یافتند (Tabatabaee *et al.*, 2013).

کلروفیل کل و کارتنوئید، در سطح احتمال ۱ درصد بود (جدول ۲). با افزایش غلظت نانونقره، تا سطح ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، میزان این شاخص‌ها افزایش و سپس کاهش پیدا کرد (شکل ۳-A, B). نتایج مشابهی در تحقیقات قبلی مشاهده شده است. میزان کلروفیل a و b با افزایش غلظت نانونقره تا غلظت ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر، در برگ‌های شمعدانی تحت تنش تاریکی، افزایش و سپس کاهش یافت. در واقع، کاربرد نانونقره، با بهبود وضعیت رنگدانه‌های فتوسنتزی، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نظیر سوپراکسید دیسموتاز و در نتیجه کاهش سنتز پراکسید هیدروژن و ممانعت از پراکسیداسیون غشاهای لیپیدی سلول، کاهش سنتز اتیلن از طریق اتصال یون‌های مثبت نقره به گیرنده‌های پروتئینی اتیلن و نیز افزایش محتوای پروتئینی برگ گیاه، باعث به تأخیر افتادن پیری و جلوگیری از زردی و ریزش برگ در این گیاه شد (Hatami & Ghorbanpour, 2014).

القای تنش اکسیداتیو در اثر غلظت‌های بالای



شکل ۳. A) غلظت کلروفیل a, b و کلروفیل کل ریز نمونه‌های GN15 تحت تأثیر غلظت‌های مختلف نانونقره. B) غلظت کارتنوئید و کربوهیدرات‌های محلول برگ ریز نمونه‌های GN15 تحت تأثیر غلظت‌های مختلف نانونقره.

Figure 3. A) Chlorophyll a, b and total chlorophyll concentrations of GN15 explants under different concentrations of nano-silver.
B) Carotenoid and leaf soluble carbohydrate concentrations of GN15 explants under different concentrations of nano-silver.

تعداد برگ، محتوای کربوهیدرات‌های محلول و رنگدانه‌های برگ شد که با افزایش بیشتر غلظت این ترکیب، روند کاهش پیدا کرد. شاخص‌های طول ساقه و تعداد ساقه نیز با افزایش غلظت تیمار نانونقره، از همان ابتدا، کاهش نشان دادند. این نتایج می‌تواند بیانگر این نکته باشد که افزایش غلظت نانونقره در محیط کشت بافت GN15 به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، روی رشد رویشی و افزایش رنگدانه‌های فتوسنتزی و کارتنوئیدی این گیاه اثر مثبت داشت، اما در غلظت‌های بالاتر، باوجود کاهش حدود ۹۰ درصدی آلودگی باکتریایی و قارچی، اثرات کاهش در رشد گیاه ایجاد نمود. لذا نانونقره می‌تواند به‌عنوان روشی کارآمد در کنترل آلودگی باکتریایی بافت‌های گیاهی به‌کار رود اما باید در غلظت صحیح استفاده شود تا در کنار اثرات ضدآلودگی، اثرات نامطلوبی بر رشد گیاه نداشته باشد.

سپاسگزاری

از همکاری دلسوزانه کارمندان محترم آزمایشگاه کشت بافت گروه باغبانی دانشگاه ارومیه، مؤسسه تولید نهال کشت بافتی اروم زیست‌تاک و رویان‌پژوهش آذربایجان به‌واسطه حمایت از این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌گردد.

نانونقره تأثیر معنی‌داری بر میزان کلروفیل a، b و کل در سیب‌زمینی کشت بافتی نداشت (Ehsanpour & Nejadi, 2013). در واقع افزایش میزان این رنگیزه‌ها در اثر تیمار نانوذرات نقره به نقش این تیمار در ممانعت از سنتز اتیلن در محیط کشت بافت مرتبط می‌باشد. نتایج حاصل از تحقیق Yusefzaiy *et al.* (2015) روی گیاه ریحان نشان داد که افزایش غلظت نانونقره باعث افزایش میزان کربوهیدرات‌های محلول برگ در این گیاه شد.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج حاصل از این بررسی مشاهده شد که نانونقره در کاهش درصد آلودگی باکتریایی ریزنمونه‌های GN15 بیشتر از کاهش درصد آلودگی قارچی مؤثر بوده و به‌دلیل بروز اثرات سمیت در غلظت‌های بالاتر از ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر باعث کاهش درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌ها شد. از سوی دیگر معلوم شد که پایه GN15 در برابر غلظت‌های بالای نانونقره حساس بوده و افزایش غلظت این ترکیب تغییرات نامطلوبی در شاخص‌های رشدی و بیوشیمیایی گیاه ایجاد کرد. افزایش غلظت تیمار نانونقره از ۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر باعث ایجاد یک روند صعودی در طول ریشه،

REFERENCES

1. Abdi, G. (2012). Evaluation the potential of Nano silver for removal of bacterial contaminations in valerian (*Valeriana officinalis* L.) tissue culture. *Journal of Biology and Environmental Science*, 6(17), 199-205.
2. Abdi, G., Salehi, H. & Khosh-Khui, M. (2008). Nano silver a novel Nano material for removal of bacterial contaminants in valerian (*Valeriana officinalis* L.) tissue culture. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30(5), 709-714.
3. Aghajani, Z., Optional, R. & Pourmadidin, A. (2014). Investigating the effects of silver nanoparticles on germination and early growth of *Thymus kotschyanus* L. *Agronomic Research in the Margin of the Desert*, 11(2), 73-81. (in Farsi)
4. Aghdaei, M., Salehi, H. & Sarmast, M. K. (2012). Effects of silver nanoparticles on *Tecomella undulata* (Roxb.) Seem. micro propagation. *Advances in Horticultural Science*, 26(1), 21-24.
5. Amirghasemi, D. (2004). *Grapes (planting, harvesting and processing)*. Tehran, Ayandegan publications. (in Farsi)
6. Arifa, S., Subramanim, S., Laeson, T., Aristunenko, D., Colbeck, L. & Demidchik, V. (2012). Nano particle inhibit root and leaf growth, induce generation of reactive oxygen species and trigger elevation of cytosolic calcium in *Arabidopsis thaliana*. In: *Proceedings of Abstracts of Plant Biology Congress*, 29 Jul-3 Aug., Albert-Ludwig's-University, Freiburg, Germany, pp: 296.
7. Arnon, A. N. (1967). Method of extraction of chlorophyll in the plants. *Agronomy Journal*, 23(1), 112-121.
8. Bhojwani, S. S. & Razdan, M. K. (1996). *Studies in plant science, plant tissue culture: theory and practice*. Elsevier Science Publishers.
9. Cassells, A. C. (1991). Problems in tissue culture: culture contamination. In: P. C. Debergh & R. H. Zimmerman (Eds.), *Micro propagation, technology and application*. (pp. 31-44.) Dordrecht: Kluwer Academic.

10. Chen, X. & Schluensener, H. J. (2008). Nano silver: a Nano product in medical application. *Toxicology Letters*, 176(2), 1-12.
11. Daryani, P., Zare, N., Chamani, A. & JavadiMajd, D. (2015). The effect of silver Nano particles on microbial contamination and in vitro growth of apical and axillary buds of hazelnut cultivars. *Biotechnology in Agriculture*, 14(1), 21-31. (in Farsi)
12. Delvin, M. R. & Withman, F. H. (2002). *Plant Physiology*. Delhi, CBs publishers and distributors, Chapter 12.
13. Dibrov, P., Dzioba, J., Gosnik, K. K. & Hase, C. C. (2002). Chemiosmosis mechanism of antimicrobial activity of Ag⁺ in *Vibrio cholera*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 46(8), 2668-2670.
14. Ehsanpour, A. A. & Nejati, Z. (2013). Effect of Nano silver on potato plant growth and protoplast viability. *Biological Letters*, 50(1), 35-43.
15. Ekhtiari, R., Mohebbi, H. R. & Mansouri, M. (2011). Investigation of Nano silver particles on salinity tolerance of *Foeniculum vulgare* Mill. in early growth in laboratory conditions. *Journal of Plant and Biological Research*, 7(27), 62-55. (in Farsi)
16. Felipe, A. J. (2009). Felinem, Garnem and Monegro almond *peach hybrid rootstocks. *HortScience*, 44(1), 196-197.
17. Fideghelli, C., Strada, G. D., Grassi, F. & Morico, G. (1998). The peach industry in the world: present situation and trend. In: Proceedings of IV international Peach symposium, *Acta Horticulture*, pp: 465.
18. Ghasemi Pirbaloti, A. (2010). *Medicinal and aromatic plants (identifying and studying their effects)*. Islamic Azad University Press, Shahr-e-Kord. (in Farsi)
19. Giridhar, P., Indu, E. P., Vijayarama, D. & Ravishankar, G. A. (2003) Effect of silver nitrate on in vitro shoot growth of coffee. *Tropical Science*, 43(3), 144-146.
20. Hatami, M. & Ghorbanpour, M. (2014). Defense enzyme activities and biochemical variations of *Pelargonium zonal* in response to Nano silver application and dark storage. *Turkish Journal of Biology*, 38(1), 130-139.
21. Irigoyen, J. J., Emerich, D. W. & Sanchez-Diaz, M. (1992). Water stress induced changes in concentrations of praline and total soluble sugars in modulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Plant Physiol*, 84(1), 55-60.
22. Jasim, B., Roshmi, T., Juothis, M. & Radhakishna, E. K. (2017). Plant growth and dysgenic enhancement effect of silver nanoparticles in Fenugreek (*Trigonella foenumgraecum* L.). *Saudi Pharm*, 25(3), 443-447.
23. Khodakovskaya, M., Dervishi, E., Mahmood, M., Xu, Y., Li, Z., Watanabe, F. & Biris, A. S. (2009). Carbon nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth. *ACS Nano*, 3(10), 3221-3227.
24. Leifert, C. & Casselles, A. C. (2001). Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 37(2), 133-138.
25. Lubick, N. (2008). Nano silver toxicity: Ions, Nano particles or both? *Environmental Science and Technology*, 42(23), 8617-8617.
26. Mahajan, Sh. & Tuteja, N. (2005). Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444(2), 139-158.
27. Mahna, N., Zununivahed, S. & Khani, S. (2013). Plant in vitro culture goes Nano: Nano silver mediated decontamination of ex vitro explants. *Nano Medicine and Nanotechnology*, 4(2), 1-4.
28. Nazari Moghaddam Aghayi, R., Yadollahi, A., Moeini, A. & Sepahvand, S. (2013). In vitro culture of Gisela 6 semi-dwarf rootstock. *Journal of Biology and Environmental Science*, 7(20), 57-64.
29. Nowroozi, M., Tedin, M. R. & Nowruz, S. (2016). Induction of oxidative stress in barley seedlings (*Hordeum vulgare* L.) in response to silver nanoparticles. *Journal of Crops and Environmental Stresses*, 1(1), 11-19. (in Farsi)
30. Perl, A., Aviv, D. & Galun, E. (1988). Ethylene and in vitro culture of potato: suppression of ethylene generation vastly improves protoplast yield, plating efficiency and transient expression of alien gene. *Plant Cell Reports*, 7(6), 403-406.
31. Rezvani, N. & Sorooshzadeh, A. (2014). Effect of Nano silver on root and bud growth of saffron in flooding stress condition. *Saffron Agriculture and Technology*, 2(1), 91-104. (in Farsi)
32. Rezvani, N., Sorooshzadeh, A. & Farhadi, N. (2012). Effect of Nano silver on growth of saffron in flooding stress. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 6(1), 517-522.
33. Roofigari Isfahan, M., Doudi, M. & Rezayatmand, Z. (2014). Anticandidal effects of aqueous and callus extracts of *Artemisia aucheri*. *International Journal of Molecular and Clinical Microbiology*, 1(1), 389-397.
34. Rostami, A. A. & Shahsavari, A. (2009). Nano-silver particles eliminate the in vitro contaminations of olive Mission explants. *Asian Journal of Plant Science*, 8(2), 505-509.

35. Safavi, K. (2014). Effect of titanium dioxide Nano particles in plant tissue culture media for enhance Resistance to bacterial activity. *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life science*, 3(5), 163-166.
36. Scrinis, G. & Lyons, K. (2007). The emerging Nano-corporate paradigm: Nano technology and the transformation of nature, food and agro-food systems. *International Journal Sociology of Food and Agriculture*, 15(2), 22-44.
37. Shokri, S., Babaie, A. R. & Ahmadian Arab, M. M. (2014). The effects of different concentrations of nano-silver on elimination of bacterial contaminations and phenolic exudation of Rose (*Rose hybrid L.*) in vitro culture. *International Journal of Farming and Applied Sciences*, 1(3), 50-54.
38. Sondi, I. & Salopek-Sondi, B. (2004). Silver Nano particles as antimicrobial agent: case study on *E. coli* as a model for gram e negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science*, 275(1), 177-182.
39. Tabatabaei, Z., Razavi-zadeh, R. & Rostami, F. (2013). Effect of nanoparticles on chlorophyll, carotenoid and flavonoids in *Brassica napus* in in vitro condition. In: *Proceedings of 2nd National Conference on Nanotechnology from Theory to Application*, 1 March, Aseman Hotel, Isfahan, Iran, pp: 1-10. (in Farsi)
40. Taghizadeh, M. & Solgi, M. (2014). The application of essential oils and silver Nano particles for sterilization of Bermuda grass explants in in vitro culture. *International Journal of Horticultural Science and Technology*, 1(2), 131-140.
41. Turhan, H. (2004). The effect of silver nitrate (ethylene inhibitor) on in vitro shoot development in potato (*Solanum tuberosum L.*). *Biotechnology*, 3(1), 72-74.
42. Vankar, P. S. & Shukla, D. (2012). Biosynthesis of silver nano particles using lemon leaves extract and its applications for antimicrobial finish on fabric. *Applied Nanoscience*, 2(2), 163-168.
43. Yin, L., Cheng, Y., Espinasse, B., Colman, B. P., Auffan, M., Wiesner, M., Rose, J., Liu, J. & Bernhardt, E. S. (2011). More than the ions: the effects of silver nanoparticles on *Lolium multiflorum*. *Environmental Science and Technology*, 45(6), 2360-2367.
44. Yusefzai, F, Pourakbar, L. & Farhadi, Kh. (2015). Effect of Nano silver on some morphological and physiological indices of Basil plant. *Iranian Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 1(2), 63-73. (in Farsi)