نشریه فیزیولوژی محیطی گیاهی، سال پانزدهم، شماره ۶۰، زمستان ۱۳۹۹ / صفحات: ۶۰-۴۸

تأثیر نانو اکسید روی بر مراحل ضدعفونی، استقرار و پرآوری درون شیشه‌ای گیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.)

احسان ثریا[۱]، غلامرضا گوهری[۲*]، علیرضا مطلبی آذر[۱]، سعیده علیزاده سالطه[۱]

[۱]گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

[۲]گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران.

تاریخ دریافت:۱۳۹۸/۰۶/۰۱ ؛ تاریخ پذیرش:۱۳۹۸/۱۱/۲۲

چکیده

کشت بافت گیاهی یکی از مهم‌ترین تکنیک‌ها در راستای تولید صنعتی متابولیت‌های ثانویه می‌باشد. سلول‌های گیاهی یک منبع مناسب و مهم برای تولید انواع متابولیت‌های ثانویه با ارزش است. بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) یکی از گیاهان دارویی مهم بوده و با داشتن متابولیت‌های ثانویه متنوع در درمان و تسکین ناراحتی‌های قلبی، عصبی و گوارشی و بویژه تقویت حافظه و درمان آلزایمر کاربرد دارد. در پژوهش حاضر تاثیر غلظت‌های مختلف نانواکسید روی (۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بر مراحل ضدعفونی و زنده‌مانی گیاهچه‌های بادرنجبویه بررسی گردید. همچنین به منظور بررسی اثر نانوذرات اکسید روی بر مراحل استقرار و پرآوری، گیاهچه‌های بادرنجبویه در محیط‌های کشت موراشیک اسکوگ حاوی نانوذرات اکسید روی در چهار غلظت مختلف (صفر، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم در لیتر) کشت شدند. بر اساس نتایج بدست آمده از این پژوهش کاربرد ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر باعث کاهش معنی‌دار آلودگی‌های باکتریایی و قارچی شد و تعداد گیاهچه‌های سالم در مقایسه با سایر تیمارها بیشتر بود. همچنین بر اساس نتایج آزمایش دوم، با افزایش غلظت نانو ذرات اکسید روی میزان رشد و پرآوری کاهش پیدا کرد. از میان غلظت‌های مختلف نانوذرات، غلظت‌های ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر نانو اکسید روی بیشترین تأثیر در افزایش معنی‌دار میزان کلروفیل و غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر بیشترین تاثیر را در افزایش کاروتنوئیدها داشت. طبق نتایج بدست آمده در این تحقیق کاربرد نانوذرات اکسید روی با کمترین غلظت (۲۵ میلی‌گرم بر لیتر)، باعث افزایش جذب آب و املاح معدنی شده و در نهایت منجر به افزایش رشد و پرآوری گیاهچه‌های بادرنجبویه گردید.

واژه‌های کلیدی: آلودگی، بادرنجبویه، نانوذره، کلروفیل، عنصر روی

مقدمه

یکی از مباحث مهم بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک، کشت بافت است. دلیل توجه به جنبه‌های مختلف کشت بافت گیاهان‌دارویی، بهینه نمودن این روش‌ها به‌عنوان ابزار مهم جهت مطالعات بعدی مربوط به عوامل مؤثر در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه و همچنین کاربرد آن‌ها در اصلاح گیاهان‌دارویی می‌باشد. تکثیر گیاهان در شرایط درون شیشه‌ای، روشی بسیار مفید جهت تولید داروهای‌گیاهی با کیفیت است. کشت سلول، بافت‌ها و اندام‌های‌گیاهی امکان تکثیر انبوه و سریع گیاهان و تولید متابولیت‌های ثانویه را در شرایط درون شیشه‌ای یا in vitroفراهم می‌سازد. با استفاده از کشت درون شیشه-ای گیاه، علاوه بر دسترسی به منبع اولیه دارو در

*نویسنده مسئول: gholamreza.gohari@gmail.com

شرایط کنترل شده و مستقل از محیط طبیعی، افزایش تولید ترکیبات نسبت به شرایط طبیعی و تولید ترکیبات جدید نیز امکان‌پذیر می‌گردد (Bourgaud et al., 2002; Gamborg and Philips, 2013).

بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) گیاهی تتراپلوئید بوده و از خانواده نعناعیان می‌باشد، از آنجایی که رایحه بادرنجبویه شبیه لیمو می‌باشد، به نام Lemon balm نیز نامیده می‌شود. در علم پزشکی امروز، بادرنجبویه به‌عنوان گیاه ضد تشنج، ضد باکتری، ضد قارچ، آنتی هیستامین، تسهیل کننده عمل هضم و تنش‌های ناشی ازسردرد مورد استفاده قرار می‌گیرد (Shakeri et al., 2016). اسانس بادرنجبویه منبع طبیعی عالی از ویتامین C و B_6، مواد معدنی، اسیدآمینه، آنزیم‌ها، کربوهیدرات‌ها، و پروتئین‌ها می‌باشد (Moradkhani et al., 2010).

موفقیت استفاده از فناوری نانو در علوم مختلف، باعث ایجاد علاقه به معرفی این علم برای تولید روش‌های جدید در سیستم‌های کشاورزی و مواد غذایی شده است. بر اساس گزارشی عناصر در حد نانو دارای سطح ویژه زیادی هستند و همین سطح ویژه، کارکرد آنها را بسیار افزایش می‌دهد (Khodakovskaya et al., 2012). استفاده از فناوری نانو در سیستم‌های کشاورزی در شاخه‌ای از علم نانو به نام کشاورزی نانو مورد مطالعه قرار می‌گیرد. کشاورزی نانو شامل استفاده از نانو ذرات در راستای استفاده از اثرات مفید آن‌ها در گیاهان است (Saraswathi and Srinivasan, 2010). در میان نانو ذرات اکسید فلزی، نانو ذرات اکسید روی به طور گسترده‌ای در بسیاری از تغییرات شیمیایی استفاده می‌شود. اثر مثبت نانو ذرات اکسید روی بر میزان کال‌زایی و زنده مانی کالوس گل راعی شاید به‌دلیل افزایش فعالیت آنزیم‌های درگیر در این مسیر باشد. زیرا روی از کوفاکتورهای مهم دخیل در فعالیت آنزیم‌ها است و این ذرات به دلیل سطح ویژه زیاد، قادرند کارکرد این آنزیم‌ها را افزایش دهند (Sharafi et al., 2013). در دهه‌های اخیر نانواکسید روی به‌طور گسترده‌ای در صنعت استفاده می‌شود. با این حال مطالعات چندانی در مورد سنتز و ظرفیت استفاده از آن در کشاورزی انجام نشده است. روی یک جزء مهم از آنزیم‌های مختلف است که مسئول انجام بسیاری از واکنش‌های متابولیک در تمام محصولات است. اگر آنزیم خاصی در بافت‌های گیاهی وجود نداشته باشد رشد و توسعه گیاهان متوقف خواهد شد. با این حال روی در مقادیر بسیار کم مورد نیاز است، بنابراین به عنوان یک ماده ریز مغذی طبقه‌بندی شده است (Avinash et al., 2010). عنصر روی برای سنتز آنزیم‌هایی که در سنتز تریپتوفان، که پیش نیاز تولید ایندول استیک اسید می‌باشد، ضروری است. روی همچنین یک جزء تشکیل‌دهنده کربنیک آنهیدراز است. این عنصر در فعالیت اکسین‌ها و سنتز پروتئین، تولید دانه و سرعت تکامل دانه ضروری است، همچنین باعث افزایش RNA می‌شود (Rehman et al., 2012). اثرات ضدمیکروبی نانو ذرات فلزی از جمله نانو ذرات اکسید روی در سال‌های اخیر مورد توجه بوده است. اثر ضد میکروبی قابل توجه و هزینه پایین نانو ذرات اکسید روی باعث کاربرد قابل توجه آن در صنایع غذایی برای کاهش رشد باکتری‌ها شده است. مطالعات مختلف نشان داده‌است که کمبود عنصر روی باعث تاخیر در بلوغ گیاه به علت تاخیر در ظهور برگ‌ها و افزایش دوره رشد رویشی می‌شود. بعضی از تحقیقات نشان می‌دهد که کمبود روی و کاهش فتوسنتز می‌تواند بر میزان رشد برگ‌ها تاثیر بگذارد (Cakmak et al., 1999). اثر منفی یا مثبت نانو ذرات به علت سطح ویژه زیاد آنهاست. بر اساس گزارشی عناصر در حد نانو دارای سطح ویژه زیادی هستند و همین سطح ویژه، کارکرد آنها را بسیار

افزایش می‌دهد. با توجه به اهمیت اقتصادی گیاه بادرنجبویه و نیز جنبه‌های دارویی این گیاه با ارزش، در این پژوهش تلاش شده است اثرات کاربرد نانو اکسید روی بر کاهش میزان آلودگی و نیز افزایش شرایط رشدی ریزنمونه‌های بادرنجبویه در شرایط درون شیشه‌ای مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی نمونه‌های گیاهی: این آزمایش در آزمایشگاه کشت بافت گیاهی گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز طی سال ۱۳۹۶-۱۳۹۵ انجام گردید. از بوته‌های بادرنجبویه‌ی کشت شده در مزرعه تحقیقاتی گیاهان دارویی دانشگاه تبریز قلمه تهیه شده و پس از انتقال به آزمایشگاه جهت رفع آلودگی‌های سطحی با آب و مایع ظرفشویی شستشو داده شدند. سپس در گلدان‌های حاوی پرلیت کشت و در شرایط مه افشان نگهداری شدند تا از آنها ساقه‌های ترد و جوان جهت استفاده در کشت بافت تولید شود در ادامه برای تغذیه قلمه‌ها از محلول غذایی هوگلند استفاده شد.

سنتز نانو ذرات اکسید روی: نانوذرات اکسید روی با روش سل-ژل، با استفاده از پلی‌اتیلن گلیکول (PEG) در آزمایشگاه نانو شیمی دانشگاه مراغه تهیه شد. ابتدا ۱/۵ گرم از PEG در ۲۰ میلی لیتر اتانول در داخل یک بشر حل شد تا یک محلول شفاف ایجاد شود. سپس ۱ گرم از $Zn(NO_3)_2 \cdot H_2O$ در داخل محلول به دست آمده حل شده و در دمای ۱۵۰°Cدر حمام روغن، تا تشکیل شدن ژل ویسکوز هم زده شد. ژل ویسکوز حاصل در دمای ۳۵۰°C به مدت نیم ساعت خشک شد. برای به دست آوردن نانو ذرات ZnO، پیش ماده‌ی متخلخل حاصل شده، به مدت ٦ ساعت در دمای ٦۰۰°C کلسینه شد و پودر شیری رنگ ZnO به دست آمد. در ادامه به‌منظور آنالیز و بررسی ویژگی‌های ساختاری نانو ذرات سنتز شده، از آنالیز XRD و نیز میکروسکوپ اتمی روبشی موجود در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه صنعتی شریف استفاده گردید (Matinise et al., 2017; Amini et al., 2020).

آزمایش اول: پس از دو ماه که قلمه‌ها به اندازه کافی رشد کردند، از هر بوته تعدادی ساقه جوان دارای گره‌های با جوانه‌های رویشی انتخاب گردید. پس از حذف پهنک برگ‌ها، قلمه‌های حدود ۵ سانتی‌متر که دارای چند گره برگی (حاوی جوانه‌های جانبی) بودند، ضدعفونی شدند. برای رفع آلودگی سطحی، قلمه‌ها به مدت یک ساعت در معرض آب جاری قرار گرفتند تا آلودگی‌های سطحی و گرد وخاک از سطح قلمه‌ها تا حد امکان شسته شود. سپس به مدت ۵ دقیقه به وسیله‌ی مایع ظرفشویی شستشو داده شدند. بعد از آن به مدت ۲ دقیقه با الکل ۷۰ درصد ضدعفونی شده و بعد از آن هم به مدت ۱۵ دقیقه با هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد شستشو شدند. سپس با غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید روی (صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی شدند. آزمایش بصورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملا تصادفی در سه تکرار اجرا گردید. پس از آن در زیر دستگاه هود لامینار و در شرایط استریل نمونه‌ها ۳ بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند تا بقایای نانوذرات از روی نمونه‌ها شسته شود (شکل ۱). به منظور بررسی تاثیر کاربرد نانواکسید روی بر میزان آلودگی ریز نمونه‌ها درصد نمونه‌های سالم و نیز نمونه‌های آلوده به آلودگی قارچی و باکتریایی شمارش و محاسبه گردید.

شکل ۱: مراحل آماده‌سازی و ریز ازدیادی گیاه بادرنجبویه در شرایط درون شیشه‌ای

آزمایش دوم: پس از ضدعفونی و شستشوی ریزنمونه‌ها در زیر هود لامینار، هر ریزنمونه با استفاده از اسکالپل و پنس استریل به قطعات حدود یک سانتی‌متری که هر قطعه دارای یک جوانه‌ی جانبی بود، تقسیم شدند. سپس در محیط کشت MS (موراشیگ و اسکوگ، ۱۹۶۲) حاوی هورمون‌های بنزیل آمینو پورین وجیبرلین به ترتیب با غلظت ۰/۵ و یک میلی‌گرم در لیتر کشت شدند و به‌مدت چهار هفته در شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتی‌گراد و روشنایی ۱۶ ساعت برای تولید انبوه و گیاهچه‌های سالم و عاری از آلودگی نگهداری شدند. بازکشت گیاهچه‌ها در محیط کشت جدید به فاصله‌ی هر سه هفته از آغاز کشت به مدت دو ماه در اتاق کشت و زیر هود لامینار انجام شد. نمونه‌ها در اتاق رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، شدت نور ۱۰۰ میکرومول بر متر مربع در ثانیه حاصل از لامپ‌های فلورسنت سفید و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. پس از اینکه از هر کشت به اندازه کافی ریزنمونه سالم در مرحله‌ی تکثیر بدست آمد، تیمار با غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید روی، جهت بررسی اثر این نانوذرات بر خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی هر کدام از تیمارها در شرایط درون شیشه‌ای انجام گرفت. برای این منظور گره‌های سالم

بدست آمده از مرحله قبل در تیمارهای مختلف نانوذرات اکسید روی شامل (۰، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم بر لیتر) کشت شدند. آزمایش بصورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملا تصادفی در سه تکرار اجرا گردید. کشت ریزنمونه‌ها در این مرحله در بطری‌های شیشه‌ای انجام گرفت. برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد و در هر شیشه سه ریز نمونه کشت شد. پس از کشت نمونه‌ها به مدت ۳۰ روز در اتاقک رشد و با شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتی‌گراد و تناوب نوری ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی نور فلورسنت نگهداری شدند. پس از این مدت، داده برداری و اندازه‌گیری صفات مورد نظر در سه تکرار انجام شد (شکل ۱). صفات موفولوژیکی مورد سنجش در آین آزمایش شامل طول شاخساره، تعداد شاخساره، تعداد برگ، درصد ریشه‌زایی بودند.

اندازه‌گیری رنگیزه‌های فتوسنتزی: مقدار ۰/۵ گرم از بافت تر گیاهی به همراه ۵ میلی لیتر استون ۸۰ درصد درهاون چینی ساییده شد و نهایتاً عصاره همگنی بدست آمد. نمونه‌های حاصله در ۱۲۰۰۰دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. پس از آن جذب محلول رویی به وسیله دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج‌های ٦٦٣، ٦٤٦ و ٤٧٠ نانومتر ثبت گردید و کلروفیل a, b و کلروفیل کل و کارتنوئید بر اساس روش Lichtenthaler (۱۹۸۷) محاسبه شد.

$$\text{Chl } a = (12.47 \times A663) - (3.62 \times A\ 645)$$
$$\text{Chl } b = (25.06 \times A645) - (6.5 \times A663)$$
$$\text{Carotenoids} = (1000 \times A470) - (1.29\ \text{Chl}a - 53.78\ \text{Chl}b)$$

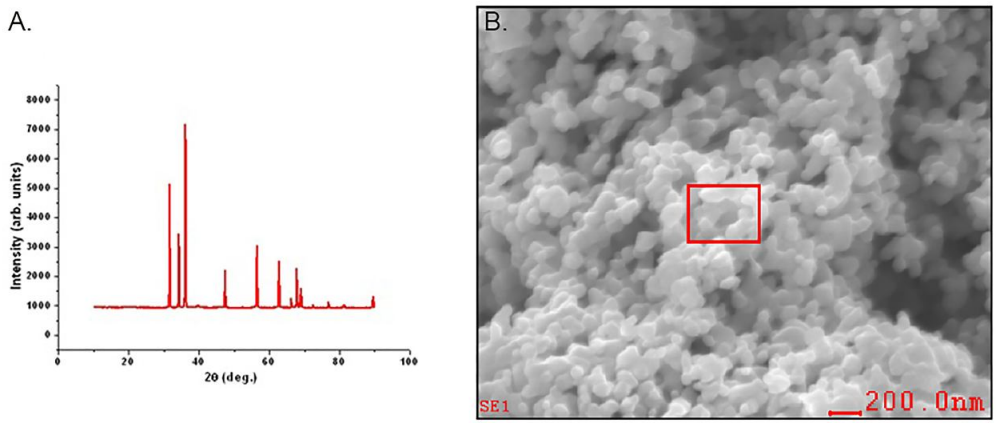
اندازه‌گیری میزان آهن و روی: اندازه‌گیری میزان آهن و روی نمونه‌های گیاهی به روش هضم تر انجام گرفت (Dong et al., 2006). ابتدا تمامی ظروف شیشه‌های مورد نیاز با اسید کلریدریک تجاری ۰/۱ درصد شسته شدند. سپس ۰/۵ گرم از ماده خشک گیاهی با ترازوی حساس دیجیتالی، با دقت ۰/۰۱ گرم اندازه‌گیری شد. مواد گیاهی توزین شده، با دقت به لوله‌های هضم منتقل گردیدند. سپس ۱۰ میلی لیتر اسید نیتریک غلیظ (٦٥ درصد) به هر لوله اضافه شد. پس از چیدن لوله‌ها درون حفره‌های اجاق هضم، روی لوله‌ها با درپوش مخصوص آن‌گرفته شدند. در این گروه از لوله‌ها دو لوله بدون ماده خشک گیاهی و فقط دارای اسید نیتریک به عنوان نمونه‌های شاهد قرار داده شدند. نمونه‌ها تا روز بعد بدون اعمال هیچ دمایی رها شدند. در روز بعد نمونه‌ها به مدت سه ساعت در دمای ٦٠ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شدند. بعد از سه ساعت، دما به تدریج تا ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد افزایش داده شد و برای شش ساعت عمل هضم انجام شد. نشانه اتمام هضم، به دست آمدن مایع زلال زرد بود. سپس لوله‌ها از روی اجاق هضم برداشته شده، در جا لوله‌ای قرارگرفتند تا خنک شوند. پس از اینکه نمونه‌های برگ گیاهی بطور جداگانه به وسیله اسید نیتریک غلیظ هضم شدند، عصاره‌ی بدست آمده، توسط کاغذ واتمن شماره ٤٢ صاف گردید و توسط آب مقطر در بالن ژوژه‌ها به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسید و سپس به فلاسک‌های حجمی ۱۰۰میلی‌لیتری انتقال پیدا کرد. برای تعیین میزان عناصر در نمونه‌های گیاهی دستگاه جذب اتمی (Shimadzu, AA6300, Japan) مورد استفاده قرار گرفت.

در این تحقیق، تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ٢٤ و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح احتمال معنی‌داری پنج درصد انجام شد. نمودارها بوسیله نرم افزار Excel رسم شدند.

نتایج

مشخصات نانوذره اکسید روی: بر اساس الگوی XRD بدست آمده می‌توان ساختار نانوذرات اکسید

روی تهیه شده را به صورت دو زیر شبکه یونهای Zn^{2+} و O^{2-} در نظر گرفت به طوری که هر یون روی توسط یونهای تتراهدرال اکسیژن در برگرفته شده‌اند و برعکس (A-۲). علاوه بر این از آنالیز تصاویر میکروسکوپ اتمی روبشی برای مطالعهٔ مورفولوژی سطح نانوذرات سنتز شدهٔ اکسید روی استفاده شد. همانطور که در شکل (B-۲) مشاهده می‌شود نانوذرات اکسید روی تجمع یافته به صورت کروی شکل در اندازه‌ای مابین ۸۰ الی ۱۰۰ نانومتر می‌باشند.

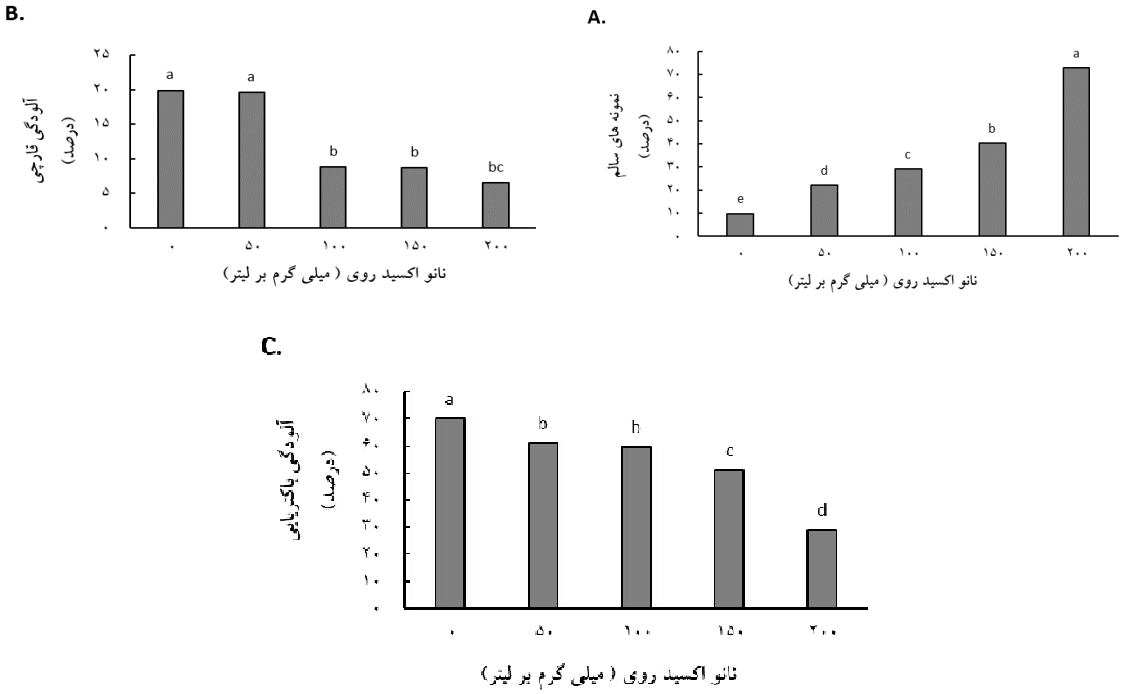


شکل ۲: نتایج آنالیز نانو ذره سنتز شده با استفاده از روش پراش اشعه ایکس (A) و میکروسکوپ الکترونی روبشی (B).

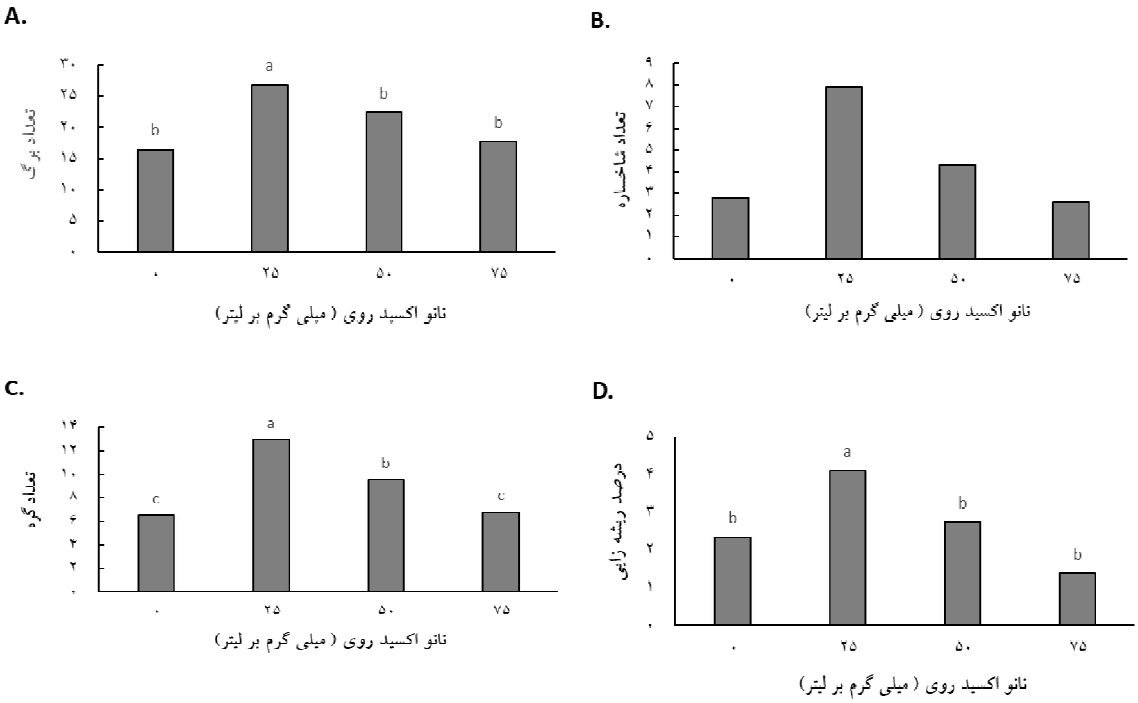
صفات مورفولوژیکی: مقایسه میانگین نتایج بدست امده از درصد نمونه‌های سالم نشان داد که با افزایش غلظت نانو اکسید روی، درصد نمونه‌های سالم نیز افزایش پیدا می‌کند به‌طوری که بیشترین درصد نمونه‌های سالم در غلظت ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر و کمترین درصد هم در غلظت صفر (شاهد) بدست آمد (شکل A–۳). همچنین مشاهده شد که نانو ذرات اکسید روی در غلظت‌های بالاتر موجب کاهش آلودگی‌های باکتریایی و قارچی شدند. به طوری که میزان آلودگی باکتریایی در غلظت صفر، بیشترین مقدار را داشت و در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو اکسید روی کمترین آلودگی را نسبت به سایر غلظت‌ها نشان داد. همچنین میزان آلودگی قارچی نیز در غلظت‌های صفر و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو اکسید روی بیشترین مقدار را نشان دادند و کمترین میزان آلودگی قارچی نیز در غلظت ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر نانو اکسید روی بدست آمد (شکل B,C–۳).

صفات رشدی: با توجه به نمودار مقایسه‌ی میانگین داده‌ها، مشخص شد که تیمار با نانو اکسید روی سبب افزایش در تعداد برگ گیاهان بادرنجبویه نسبت به شاهد گردید (شکل A–٤). بیشترین تعداد برگ بوته در تیمار با نانو اکسید روی در غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر بود. کمترین تعداد برگ هم در تیمار با نانو اکسید روی در بالاترین غلظت مشاهده گردید. تیمار گیاهان بادرنجبویه با نانو اکسید روی باعث افزایش تعداد شاخساره گردید و بیشترین تعداد شاخساره در تیمار با نانو اکسید روی در غلظت ۲۵ میلی گرم بر لیتر حاصل شد که با گیاهان دیگر یا سایر تیمارها تفاوت معنی داری نشان داد (شکل B–٤). نمودارهای مقایسه میانگین تیمار نانو اکسید روی (شکل C–٤) بر شاخص تعداد گره در گیاه بادرنجبویه نشان دهنده این است که بیشترین تعداد گره مربوط به غلظت ۲۵ میلی گرم بر لیتر نانواکسید روی بود. در شاخص درصد ریشه‌زایی مشخص گردید تیمارهای نانو اکسید روی (شکل D–٤) در غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر دارای

بیشترین درصد ریشه‌زایی نسبت به سایر غلظت‌ها بود.

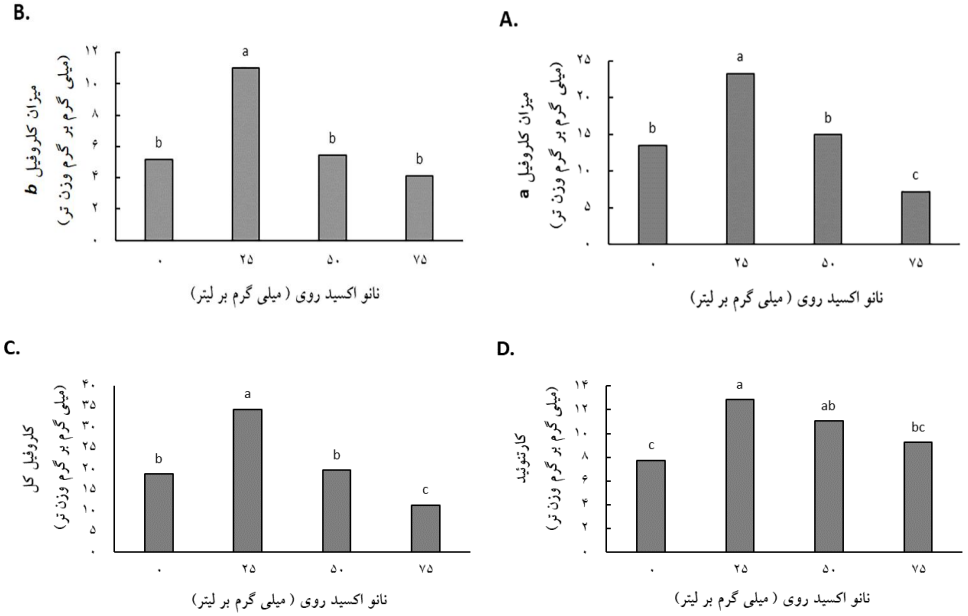


شکل ۳: تاثیر تیمار غلظت‌های مختلف نانو اکسید روی بر تعداد نمونه‌های سالم (A)، درصد آلودگی قارچی (B) و درصد آلودگی باکتریایی (C) در گیاه بادرنجبویه در شرایط درون شیشه‌ای (حروف متفاوت نشان دهنده معنی‌دار بودن در سطح یک درصد آزمون دانکن می‌باشند).



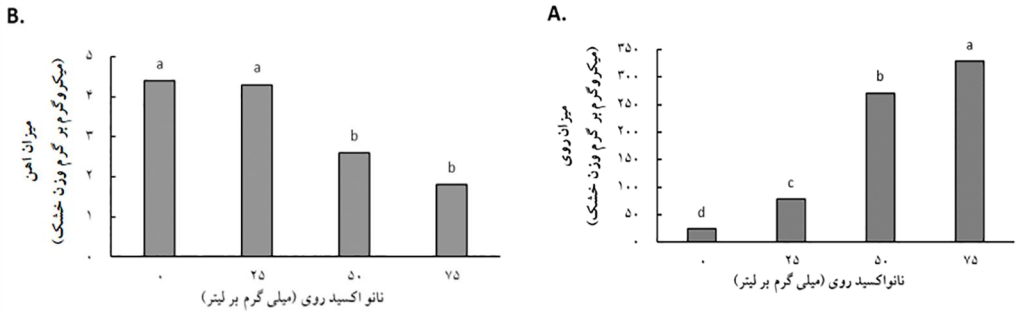
شکل ٤: تاثیر تیمار غلظت‌های مختلف نانو اکسید روی بر تعداد برگ (A)، تعداد شاخساره (B)، تعداد گره (C) و درصد ریشه زایی (D) در گیاه بادرنجبویه در شرایط درون شیشه‌ای (حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطح یک درصد آزمون دانکن می‌باشند).

رنگیزه‌های فتوسنتزی: با توجه به نمودار مقایسه میانگین داده‌ها چنین برداشت شد که بیشترین مقدار کلروفیل a، مقدار کلروفیل b و کلروفیل کل مربوط به گیاهانی بود که با استفاده از تیمارهای نانو اکسید روی در غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر تیمار شده بودند و کمترین مقدار کلروفیل هم در غلظت ۷۵ میلی گرم بر لیتر مشاهده شد (شکل A, B, C–۵). علاوه بر این نتایج این پژوهش نشان داد که گیاهان بادرنجبویه تیمار شده با نانو اکسید روی در غلظت‌های ۲۵ و۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو اکسید روی دارای حداکثر میزان کارتنوئید می‌باشند (شکل D–۵).



شکل ۵: تاثیر تیمار غلظت‌های مختلف نانو اکسید روی بر میزان کلروفیل *a* (A)، کلروفیل *b* (B)، کلروفیل کل (C) و کارتنوئید (D) در گیاه بادرنجبویه در شرایط درون شیشه‌ای (حروف متفاوت نشان دهنده معنی‌دار بودن در سطح یک درصد آزمون دانکن می‌باشند).

میزان آهن و روی: با توجه به نمودار مقایسه‌ی میانگین تیمار نانو اکسید روی بر میزان عنصر روی در گیاه بادرنجبویه مشخص شد که بیشترین میزان روی در برگ‌های گیاه بادرنجبویه مربوط به غلظت ۷۵ میلی گرم بر لیتر و کمترین مقدار این عنصر در غلظت صفر بود. با توجه به قرارگیری غلظت بالای این تیمار (نانو اکسید روی) در محیط کشت گیاه، جذب این عنصر افزایش یافته و سمیت ایجاد گردیده و موجب تاثیر نامطلوب در گیاه گشت (شکل A–٦). همچنین با افزایش غلظت نانو اکسید روی میزان جذب آهن از طریق ریشه کاهش یافته و در نتیجه کمترین میزان آهن تحت تیمار نانو اکسید روی در غلظت ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده گردید. بیشترین جذب این عنصر مربوط به غلظت‌های پایین نانو اکسید روی در اطراف ریشه بود (شکل B–٦).



شکل ٦: تاثیر تیمار غلظت‌های مختلف نانو اکسید روی بر میزان روی (A) و آهن (B) در گیاه بادرنجبویه در شرایط درون شیشه‌ای (حروف متفاوت نشان دهنده معنی‌دار بودن در سطح یک درصد آزمون دانکن می‌باشند).

بحث

با توجه به نتایج مشخص شد که استفاده از محلول نانو اکسید روی با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به مدت ۱۵ دقیقه برای ضد عفونی کردن ریزنمونه‌ها مناسب می‌باشد. البته در مورد غلظت نانو اکسید روی باید اشاره کرد که پس از بررسی غلظت‌ها و زمان‌های مختلف در نهایت غلظتی که بیشترین ریزنمونه سالم و زنده و کمترین آلودگی را داشت، غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در مدت زمان ۱۵ دقیقه بود. نتایج محققان پیشین نشان می‌دهد که تیمار گیاهان موز با نانو ذرات روی و اکسید روی باعث ایجاد موفقیت در کشت بافت این گیاه همراه با از بین رفتن آلودگی‌های میکروبی بدون تاثیر منفی بر شاخص‌های رشدی شده است (Helaly et al., 2014). همچنین آنها گزارش کردند که نانوذرات روی و اکسید روی با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در مورد پیشگیری از آلودگی‌های میکروبی و تولید گیاهان سالم رضایت بخش بودند و گیاهان تیمار شده نیز با موفقیت (۹۸٪) در شرایط مزرعه‌ای قرار گرفتند. بر اساس گزارش Falkiner (۱۹۹۰) عامل‌هایی که به طور خاص بر دیواره سلولی باکتری‌ها عمل می کنند، برای کنترل عفونت‌های باکتریایی در کشت‌های بافت گیاهی مناسب‌تر هستند. توضیح احتمالی ممکن است این باشد که نانو ذرات روی و اکسید روی سنتز دیواره سلولی باکتری را مهار می‌کنند تا از آلودگی جلوگیری کنند. با این وجود، نانو ذرات به دلیل حساسیت کم، سادگی، هزینه پایین و مناسب بودن بیش از مواد شیمیایی ناپایدار در برابر باکتری‌ها و قارچ‌ها بهتر عمل می‌کند (Wang et al., 2001). همچنین Burman و همکاران (۲۰۱۳) نیز اشاره کردند که علت کلیدی افزایش میزان رشد در تیمار با نانوذرات ویژگی‌های ضدمیکروبی این ذرات است که مقاومت گیاه به عوامل میکروبی را افزایش می‌دهد. با توجه به نتایج بدست آمده چنین به نظر می‌رسد که روش فوق یک روش سریع در ضدعفونی ریزنمونه‌های حاصل از گیاهان بالغ بادرنجبویه باشد.

بر اساس اطلاعات موجود، مکانیسم کلی اثر نانو ذرات در افزایش رشد و پرآوری به طور دقیق مشخص نیست. احتمال می‌رود افزایش جذب آب دلیل اصلی افزایش رشد در گیاهچه‌ها باشد. نانو ذرات با نفوذ به دیواره سلولی و غشای سلولی، تشکیل منافذ جدید داده و همانند یک کانال عمل کرده و از این طریق، راه ورود آب و املاح معدنی به گیاه بیشتر می‌شود (Tiwari et al., 2013). افزایش آب باعث افزایش تورژسانس می‌شود و به دنبال آن پتانسیل اسمزی سلول تغییر پیدا کرده و املاح معدنی بیشتری جذب سلول می‌شوند. در این حین سیگنال‌های آنزیمی و هورمونی بالا رفته و فعالیت

آنزیم‌های رشدی و همچنین هورمون‌های جیبرلین و اکسین افزایش پیدا می‌کند و باعث توسعه بافت شده و رشد صورت می‌گیرد (Taiz and Zeiger, 2002). بر اساس گزارش Liu و همکاران (۲۰۰۹) رشد و توسعه سلول در منطقه جذب آب ممکن است به این دلیل باشد که نانو ذرات می‌توانند توزیع هورمون و سازماندهی میکروتوبول‌ها را در جهت تسریع رشد و تقسیم سلولی تحت تأثیر قرار دهند. همچنین نانو مواد می‌توانند با ایجاد پروتئین‌های حامل، از طریق آکواپورین‌ها و کانال‌های یونی به وسیله ایجاد منفذهای جدید وارد سلول‌های گیاهی شوند و منجر به اصلاح بیان ژن گیاه و مسیرهای بیولوژیکی مرتبط شده و در نهایت باعث افزایش بازدهی و عملکرد، بهبود سیستم‌های رشدی محصول و بهبود کیفیت در بسیاری از گیاهان شوند (Aslani et al., 2014). مشاهده شده است که نانو ذرات روی در افزایش پارامترهای رشدی گیاهان موز (Helaly et al., 2014)، نخود (Burman et al., 2013)، بادام زمینی (Pradad et al., 2012; Singh et al., 2015)، پیاز و سویا (Khot et al., 2012) اثر مثبت داشته است. در همین راستا، Helaly و همکاران (2014) در آزمایش کشت بافت گیاه موز مشاهده کردند که در محیط بدون حضور نانو ذرات اکسید روی (کنترل) ریشه‌زایی اتفاق نمی‌افتد. حداکثر ریشه‌زایی (۸۹٪)، میانگین تعداد ریشه در ساقه (۶/۵۷٪) و حداکثر میانگین طول ریشه (۲/۹۳ سانتی‌متر) در محیط کشت حاوی نانو ذرات روی در ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بدست آمد. نتایج مشابهی نیز توسط Burman همکاران (۲۰۱۳) گزارش شده‌است که حضور نانو ذرات روی در محیط رشد نخود باعث افزایش وزن خشک این گیاه می‌گردد که با نتایج این آزمایش مطابقت دارد. طبق نتایج مشابه این آزمایش در گزارشی که توسط Singh و همکاران (۲۰۱۵) ارائه شده است استفاده از نانو ذرات اکسید مس در گندم باعث افزایش رشد و بیوماس شده و نانو ذرات اکسید روی در نخود باعث افزایش وزن تر و شاخساره و پرآوری شده و در بادام زمینی نیز باعث افزایش رشد ریشه و شاخساره شده و عملکرد را افزایش می‌دهد و همچنین در ارزن به طور معنی‌داری باعث افزایش رشد شاخساره و افزایش عملکرد می‌شود. چنین به نظر می‌رسد که حضور نانو ذرات اکسید روی در محیط کشت باعث افزایش شاخص‌های رشدی و در نتیجه بهبود شرایط کشت بافت گیاه بادرنجبویه گردد. یکی دیگر از شاخص‌هایی که در این آزمایش با استفاده از نانو ذرات اکسید روی در غلظت‌های پایین در گیاه بادرنجبویه افزایش یافت تعداد گره بود که بالا بودن تعداد گره در ریزازدیادی گیاهان نقش مهمی دارد چرا که هرکدام از گره‌ها می‌تواند به یک ریزنمونه و در نهایت یک گیاهچه و بوته مستقل تبدیل شود (Parabia et al., 2007).

کلروفیل نقش بسیار مهمی در فرآیندهای رشدی گیاهان دارد. بیوسنتز و تخریب کلروفیل تحت مسیرهای پیچیده سلولی و مولکولی است و این مسیرها توسط فاکتورهای مختلفی تنظیم می‌شوند. تیمار گیاهان موز با نانو ذرات روی و اکسید روی نشان دهنده افزایش کلروفیل کل و نسبت کلروفیل a به کلروفیل b نسبت به شاهد بود. کلروفیل کل و میزان کلروفیل a وb به‌وسیله تیمار نانوذرات تحت تأثیر قرار گرفتند و بیشترین میزان توسعه کامل سلول‌های بازسازی شده در شرایط درون شیشه‌ای را به خود اختصاص دادند. با این حال درصد افزایش کلروفیل در گیاهان تیمار شده با نانو اکسید روی بیشتر بود (Helaly et al., 2014). بررسی‌های Vankhadeh (۲۰۰۲) نشان داد که محتوای کلروفیل برگ و وزن خشک گیاه در تیمارهای حاوی نانو ذرات روی افزایش یافت. همچنین Zheng و همکاران

(۲۰۰۵) نیز گزارش دادند که تیمار گیاهان اسفناج با نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم می‌تواند به طور قابل توجهی باعث تقویت تشکیل کلروفیل در اسفناج شود. بدین طریق که با افزایش میزان فعالیت آنزیم روبیسکو، میزان فتوسنتز به‌طور واضح افزایش می‌یابد و باعث افزایش رشد و توسعه اسفناج می‌شود. چنین به نظر می‌رسد که افزایش میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی و کاروتنوئیدها تحت تیمار نانو اکسید روی بر نقش حفاظتی این مواد به عنوان بازدارنده تولید مواد خارجی در محیط کشت بافت دلالت می‌کند، لذا حضور نانو اکسید روی در محیط کشت بافت گیاه بادرنجبویه در غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر به‌منظور افزایش کلروفیل کل و کاروتنوئیدها در این گیاه می‌تواند مفید باشد.

کاربرد مقادیر مختلف روی بر تجمع ماده خشک و میزان این عنصر در بذر گندم، نشان داد که با افزایش مصرف روی، عملکرد ماده خشک و میزان روی در بذر افزایش یافت (Zeyaeyan and Malakouti, 2000). بررسی‌ها نشان داده‌اند که نانو اکسید روی بر میزان جذب عناصر تاثیر دارد. با افزایش مصرف نانو اکسید روی، میزان روی نیز در گیاه افزایش می‌یابد. افزایش میزان روی در ذرت با کاربرد سولفات روی گزارش شده است. آزمایشات مختلف نشان داده‌اند که با افزایش کاربرد روی، میزان روی در ریشه، ساقه و برگ ذرت افزایش می‌یابد به‌طوری‌که مقدار آن در اندام‌های هوایی بیشتر از ریشه می‌باشد. طبق نتایج بدست آمده افزایش نانو اکسید روی در محلول غذایی منجر به کاهش سطح آهن در اندام‌های هوایی گیاه پریوش شد. بر اساس نتایج پیشین ثابت شده است دو عنصر روی و آهن اثرات آنتاگونیستی دارند به‌طوری که مصرف زیاد روی، باعث کاهش جذب آهن در بافت‌های گیاهی می‌شود. (Cakmak et al., 2010; Velu et al., 2014). در گیاه دارویی مرزه سطوح بالای روی، میزان و جذب آهن موجود در شاخساره را نسبت به شاهد کاهش و میزان و جذب آهن ریشه نسبت به شاهد افزایش نشان داد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که کاهش در میزان و جذب آهن اندام هوایی در سطوح بالای روی به‌دلیل اثرهای ضدیتی و برهم خوردن تعادل عناصر غذایی در این سطوح باشد (Velu et al., 2014). این کاهش غلظت و جذب آهن در اندام هوایی بیانگر آن است که برهمکنش منفی بین آهن و روی در سطوح بالای عنصر روی اتفاق افتاده است و در غلظت‌های پایین این اثر مشاهده نشد که این نتایج با یافته‌های Öncel و همکاران (۲۰۰۰)، Peralta-Videa و همکاران (۲۰۰۲) مطابقت داشت.

نتیجه‌گیری نهایی

نتایج این پژوهش نشان داد که نانو ذرات اکسید روی می‌توانند در غلظت‌های کم به طور قابل توجهی باعث افزایش پارامترهای رشد و پرآوری و همچنین پرنگیزه‌های فتوسنتزی شوند. بنابراین به نظر می‌رسد که نانو اکسید روی با مکانیسم‌های خاصی همچون خواص ضد میکروبی، افزایش جذب آب و املاح، باعث تحریک رشد و طویل شدن سلول‌ها و همچنین بهبود فعالیت سلول‌های گیاهی می‌شوند. به دنبال افزایش رشد سلول‌ها و افزایش سرعت متابولیسم در آن‌ها، سرعت رشد و پرآوری گیاهچه‌ها هم بیشتر شده و متابولیت‌های تولیدی توسط سلول‌ها با سرعت بیشتری افزایش پیدا می‌کنند. بر اساس نتایج بدست آمده در این آزمایش، غلظت‌های ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر از نانو ذرات اکسید روی می‌تواند با بهبود شاخص رشدی و بیوشیمیایی این گیاه باعث بهبود تولید درون شیشه ای گیاه بادرنجبویه گردد.

References

Amini, M., Seifi, M., Akbari, A. and Hosseinifard, M. (2020). Polyamide-zinc oxide-based thin film nanocomposite membranes: Towards improved performance for forward osmosis. Polyhedron. 179: 114362.

Aslani, F., Bagheri, S., Julkapli, N.M., Juraimi, AS., Golestan Hashemi, F.S. and Baghdadi, A. (2014). Effects of engineered nanomaterials on plants growth. Scientific World Journal. 12: 1-28.

Avinash, C., Pandey, S. and Raghvendra, S. (2010). Application of ZnO nanoparticles in influencing the growth rate of Cicer arietinum. Journal of Experimental Nanoscience. 5(6): 488–497.

Bourgaud, F., Gravot, A. and Goniter, E. (2002). Production of plant secondary metabolites. Plant Science. 161: 839-851.

Burman, U., Saini, M. and Kumar, P. (2013). Effect of zinc oxide nanoparticles on growth and antioxidant system of chickpea seedlings. Toxicological and Environmental Chemistry. 95(4): 605-612.

Cakmak, I., Kalaycı, M., Ekiz, H., Braun, H.J., Kılınç, Y. and Yılmaz, A. (1999). Zinc deficiency as a practical problem in plant and human nutrition in Turkey: a NATO-science for stability project. Field and Crops Research. 60(2): 175-188.

Cakmak, I., Pfeiffer, W.H. and McClafferty, B. (2010). Biofortification of durum wheat with zinc and iron. Cereal Chemistry, 87(1): 10-20.

Dong, J. Wu, F. and Zhang, G. (2006). Influence of cadmium on antioxidant capacity and four microelement concentrations in tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum* L.). Chemosphere. 64: 1659-1666.

Falkiner, F.R. (1990). The criteria for choosing an antibiotic for control of bacteria in plant tissue culture. IAPTC Newsletter. 60: 13-22.

Gamborg, O. and Phillips, G.C. (2013). Plant cell, tissue and organ culture: fundamental methods. Springer Science and Business Media.

Helaly, M.N., El-Metwally, M.A., El-Hoseiny, H., Abdelaziz Omar, S. and El-Sheery, N.I. (2014). Effect of nanoparticles on biological contamination of in vitro cultures and organogenic regeneration of banana. Australian Journal of Crop Science. 8(4): 612-654.

Khodakovskaya, M.V., De Silva, K., Biris, A.S., Dervishi, E. and Villagarcia, H. (2012). Carbon nanotubes induce growth enhancement of tobacco cells. ACS Nano. 6(3): 2128-2135.

Khot, L.R., Sankaran, S., Maja, J.M., Ehsani, R. and Schuster, E.W. (2012). Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection. Crop Protection. 35: 64-70.

Lichtenthaler, H.K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in Enzymology. 148: 350-382.

Liu, Q., Chen, B., Wang, Q., Shi, X., Xiao, Z., Lin, J. and Fang, X. (2009). Carbon nanotubes as molecular transporters for walled plant cells. Nano Letters. 9(3): 1007-1010.

Matinise, N., Fuku, X.G., Kaviyarasu, K., Mayedwa, N. and Maaza, M. (2017). ZnO nanoparticles via *Moringa oleifera* green synthesis: Physical properties & mechanism of formation. Applied Surface Science. 406: 339-347.

Parabia, F.M., Gami, B., Kothari, I.L., Mohan, J.S.S. and Parabia, M.H. (2007). Effect of plant growth regulators on in vitro morphogenesis of Leptadenia reticulate. Form nodal explants. Current Science. 92: 1290-1293.

Peralta-Videa, J., Gardea-Torresdey, E., Gomez, K.J. Tiemann, J.G., Parsons, and Carrillo, G. (2002). Effect of mixed cadmium, copper, nickel and zinc at different pHs upon alfalfa growth and heavy metal uptake. Environ. Pollution. 119(3): 291-301.

Prasad, T.N., Sudhakar, V.K.V., Sreenivasulu, P., Latha, Y., Munaswamy, P., Reddy, V. and Pradeep, T. (2012). Effect of nanoscale zinc oxide particles on the germination, growth and yield of peanut. Journal of Plant Nutrition. 35(6): 905-927.

Rehman, H.U., Aziz, T., Farooq, M., Wakeel, A. and Rengel, Z. (2012). Zinc nutrition in rice production systems: a review. Plant and Soil. 361(2): 203-226.

Saraswathi, R. and Srinivasan, C. (2010). Nano-agriculture-carbon nanotubes enhance tomato seed germination and plant growth. Current Science. 3: 99-274.

Sharafi, E., Khayam Nekoei, S.M., Fotokian, M.H., Davoodi, D., Hadavand Mirzaei, H. and Hasanloo, T. (2013). Improvement of hypericin and hyperforin production using zinc and iron nano-oxides as elicitors in cell suspension culture of St John's wort (*Hypericum perforatum* L.). Journal of Medicinal Plants By-products. 2: 177-184.

Shakeri, A., Sahebkar, A. and Javadi, B. (2016). Melissa officinalis L.–A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. Journal of Ethnopharmacology. 188: 204-228.

Singh, A., Singh, N.B., Hussain, I., Singh, H. and Singh, S.C. (2015). Plant-nanoparticle interaction: An approach to improve agricultural practices and plant productivity. International Journal of Pharmaceutical Science and Invention. 4(8): 25-40.

Taheri, M., Ataiei Qarache, H., Ataei Qarache, A., and Yoosefi, M. (2015). The effects of zinc-oxide nanoparticles on growth parameters of corn. Stem Fellowship Journal. 1(2): 17-20.

Taiz, L. and Zeiger, E. (2002). Plant Physiology, 3rd Edn. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., Publishers. 690 pp.

Tiwari, D.K., Dasgupta-Schubert, N., Villasenor Cendejas, L.M., Villegas, J., Carreto Montoya, L. and Borjas Garcia, S.E. (2013). Interfacing carbon nanotubes (CNT) with plants: enhancement of growth ,water and ionic nutrient uptake in maize (*Zea mays*) and implications for nanoagriculture. Applied Nanoscience. 4(5): 577-591.

Vankhadeh, S. (2002). Response of sunflower to applied Zn, Fe, P, N. Revista. Cientifica. UDO. Agricola. 1: 143-144

Velu, G., Ortiz-Monasterio, I., Cakmak, I., Hao, Y. and Singh, R.P. (2014). Biofortification strategies to increase grain zinc and iron concentrations in wheat. Journal of Cereal Science. 59(3): 365-372.

Wang, X.D., Sun, C., Gao, S.X., Wang, L.S. and Han, K. (2001). Validation of germination rate and root elongation as indicator to assess phytotoxicity with *Cucmis sativus*. Chemosphere. 44: 1711-1721.

Zeyaeyan, A. and Malakote, M.J. (2000). Effects of zinc application on growth and yield of wheat in Calcareous soils. Plant and Soil. 2: 99-110.

Zheng, L., Hong, F.S., Lu, S.P. and Liu, C. (2005). Effects of nano TiO_2 on strength of naturally aged seeds and growth of spinach. Biological Trace Elements Research. 104: 83-91.

Zwenger, S., Basu, C. (2008). Plant terpenoids: Applications and future potentials. Biotechnology and Molecular Biology Reviwe. 3: 1-7.