مجله زیست فناوری گیاهان دارویی
سال چهارم، شماره اول، بهار و تابستان ۱۳۹۷

باززایی در گل راعی (*Hypericum perforatum*): برهم کنش نانو ذرات نقره با سایر عوامل

مهدی سلطانپور[۱*]، ناصر مهنا[۱] و نادر فرساد اختر[۲]

چکیده

گل راعی (*Hypericum perforatum*) یک گیاه گلدار و چند ساله با خواص دارویی با ارزش است. سیستم‌های درون شیشه‌ای، ابزاری مهم برای بدست آوردن گیاهان یکنواخت ژنتیکی است که در نهایت می‌تواند به عنوان منبعی از ترکیبات دارویی مطلوب باشد، تحقیق حاضر با هدف دستیابي به يك پروتكل باززايي كاراتر جهت استفاده در برنامه‌هاي مهندسي‌ژنتيك اين گياه انجام شد. در این تحقیق اثرات سطوح مختلف نانو ذرات نقره (۰، ۰/۵، ۱، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم در لیتر) و اثر متقابل آن با تنظیم کننده های رشد و ریزنمونه بر باززایی این گیاه در شرایط درون شیشه‌ای در قالب یک آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار و پنج ریزنمونه در هر تکرار مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج بدست آمده، غلظت هورمونی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر (N-(2-Chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea (CPPU و ۱ میلی‌گرم در لیتر ایندول استیک اسید مناسب‌ترین غلظت برای باززایی گل راعی بود. غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات نقره در ریزنمونه برگ باعث افزایش طول شاخساره در گل راعی شد ولی غلظت بالای نانو ذرات نقره (۵ میلی‌گرم در لیتر) باعث کاهش معنی‌دار باززایی گردید. همچنین شاخساره‌های برگ گل راعی روی محیط MS ۲/۱ که حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بودند ریشه‌زایی مناسبی نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: گل راعی، N-(2-Chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea ، ایندول استیک اسید، باززایی، نانو ذرات نقره

[۱] دانشگاه تبریز، دانشکده کشاورزی، گروه علوم باغبانی. * نویسنده مسئول، ایمیل: mehdisoltanpour67@gmail.com
[۲] دانشگاه تبریز، گروه زیست شناسی

مقدمه

گل راعی یک گیاه گلدار و چند ساله متعلق به خانواده Clusiaceae (Hypericaceae) است (Klemow et al., 2004). این گیاه بومی اروپا، غرب آسیا، شمال آفریقا و بسیاری از نقاط جهان، به ویژه شمال امریکا و استرالیا می‌باشد (Saddiqe et al., 2010). موفقیت در بسیاری از تکنیک‌های گزینش در شرایط درون شیشه‌ای و اعمال فنون دست‌ورزی ژنتیکی در گیاهان به باززایی موفق گیاهان بستگی دارد (Chawla, 2002). از عوامل موثر بر باززایی می‌توان به تنظیم کننده‌های رشد و نانو ذرات اشاره نمود. ترکیبات سنتزی که مانند هورمون های رشد گیاهی طبیعی عمل می‌کنند باززایی بیشتری در مقایسه با هورمون‌های درون‌زاد معادل خود دارند (Gaspar et al., 1996). در مورد جنبه‌های مختلف کشت بافت گل راعی تحقیقات مختلفی مورد بررسی قرار گرفته و سعی شده است که با انتخاب تنظیم کننده‌های رشد مناسب امکان باززایی بیشتر شاخساره فراهم شود. از بین سیتوکینین‌های فنیل اوره‌ای، اثر TDZ روی علف چای مورد مطالعه قرار گرفته است. نتایج حاصل بیانگر این است که kinetin و BAP اثر بیشتری نسبت به TDZ بر شاخه‌زایی این گیاه داشته است (Santarém and Astarita, 2003). در بعضی موارد CPPU اثر بهتری نسبت به سایر تنظیم کننده‌های رشد داشته است. CPPU با فعالیت شبه سیتوکینینی خود می‌توانند جایگزین مناسبی برای سیتوکینین‌هایی مثل BAP باشند که به طور معمول در کشت بافت استفاده می‌شوند. CPPU و TDZ به منظور مطالعات مورفوژنز گیاهان به طور گسترده‌ای در کشت بافت مورد استفاده قرار می‌گیرد (Ricci and Bertoletti, 2009). تسورو و همکاران (۱۹۹۹) سرعت تشکیل شاخه و شاخه‌زایی را در محیط کشت MS حاوی سایتوکینین‌های BA، CPPU و TDZ در گیاه اسطو خودوس مورد بررسی قرار دادند و بیشترین شاخه‌زایی را در محیط کشت حاوی ۰/۹۹ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۰۹۹ میلی‌گرم در لیتر CPPU مشاهده کردند. تحقیق لیو و همکاران (۱۹۹۴) نشان داده است که در کشت ریزنمونه کالوس حاصل از کوتیلدون رقم سیب فوجی در محیط کشت 1/2 MS حاوی CPPU، تعداد و درصد شاخساره نسبت به محیط کشت حاوی TDZ و BA بیشتر است. انتخاب محیط کشت برای انگیزش کالوس در علف چای بیش‌تر به هدف آزمایش بستگی دارد. اگر هدف باززایی علف چای باشد IAA و غلظت پایین NAA مناسب می‌باشد ولی زمانی که هدف کشت سوسپانسیون سلولی است، 2,4-D مناسب‌ترین تنظیم کننده رشد می‌باشد (Cardoso and De Oliveira, 1996). تشکیل شاخه در شرایط درون شیشه‌ای به نوع ریز نمونه مورد استفاده نیز بستگی دارد. آیان و همکاران (۲۰۰۵) نشان دادند که متوسط تعداد شاخساره حاصل از کالوس در ریزنمونه برگ گل راعی به طور معنی‌داری بالاتر از کالوس بدست آمده از ریز نمونه ساقه می‌باشد. از سایر عوامل موثر بر باززایی می‌توان به نانو ذرات اشاره نمود. فناوری نانو، پتانسیل آن را دارد که انقلابی را در کشاورزی و سیستم‌های زیستی ایجاد نماید (Scott et al., 2003). فناوری نانو به سرعت در حال توسعه است و اثرات قابل توجهی بر اقتصاد جامعه و محیط زیست دارد. بدین ترتیب هر دو پاسخ مثبت و منفی از سوی دولت‌ها، دانشمندان و رسانه‌های اجتماعی در سرتاسر جهان برای تولید آن وجود دارد (Lin and Xing, 2007). با وجود اینکه گزارشاتی در مورد اثرات سمی نانوذرات فلزات سنگین برای گیاهان و جانوران وجود دارد اما تاکنون گزارشی مبنی بر اثرات مضر نانوذرات در کشت بافت گیاهان ارائه نشده است (Anwaar et al., 2016). اخیرا تیم‌های مختلف تحقیقاتی درصدد یافتن کاربردهایی از این مواد در علوم بیولوژی و بیوتکنولوژی برآمده‌اند و اثرهای این مواد از جمله نانو سیلور را بر ضدعفونی بذر، زنده‌مانی گیاهان،

ضدعفونی بافت‌های گیاهی برای کشت درون شیشه‌ای و مانند آن بررسی نموده‌اند. با وجود این، بررسی اثر این ماده بر تحریک پاسخ گیاه به عوامل رشد و نموی در شرایط درون شیشه‌ای هنوز بسیار نوآورانه است (Abdi et al., 2008؛ Mahna et al., 2013؛ Hojjat and Hojjat, 2015). گزارشات حاکی از آن است که نانوذرات نقره در غلظت‌های پایین سبب بهبود جوانه‌زنی و رشد اولیه گیاه شنبلیله می‌شوند (Hojjat and Hojjat, 2015). همچنین مهنا و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که استفاده از غلظت‌های پایین نانوذرات نقره با از بین بردن آلودگی و بدون عوارض جانبی، باعث زنده‌مانی همه بذور آرابیدوپسیس و زنده‌مانی ریزنمونه‌های برگ و کوتیلدون در سیب‌زمینی و گوجه فرنگی در شرایط درون شیشه‌ای می‌شود. نیلانتی و یانگ (۲۰۱۴) نشان دادند که غلظت‌های بالای نیترات نقره بازدارنده رشد گیاهان می‌باشد. آنها با کشت سرخارگل در محیط کشت MS نشان دادند که شاخه‌زایی در محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف نیترات نقره و سولفات مس تحت تاثیر قرار نمی‌گیرد و غلظت‌های بالاتر نیترات نقره به‌عنوان بازدارنده رشد این گیاه عمل می‌کند. سیف سهندی و همکاران (۲۰۱۱) نیز اظهار داشتند که افزایش غلظت نیترات نقره باعث افزایش ترکیبات پلی فنلی می‌شود ولی افزایش غلظت نانوذرات نقره باعث کاهش این ترکیبات می‌گردد. بنابرین نانوسیلور می‌تواند به عنوان جایگزین مناسبی برای دیگر ترکیبات نقره مورد استفاده قرار گیرد.

آیان و همکاران (۲۰۰۵) نشان دادند که IBA و IAA بیش‌ترین اثر را در ریشه‌زایی گل راعی دارند. در مطالعات انجام یافته برای انگیزش تشکیل ریشه IAA, IBA و NAA در چندین گونه گل راعی استفاده شده است. بر این اساس مشاهده شد که بالاترین شمار ریشه در هر شاخساره در محیط 1/2 MS و غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA حاصل می‌شود. همچنین در گیاه گل راعی گزارش شده است که شاخساره‌ها در محیط کشت حاوی IBA دارای ریشه‌های ضخیم‌تر و انشعابات بیش‌تری بودند، در حالی که در محیط کشت فاقد IBA ریشه‌های نازک و طویل مشاهده شد (Pretto and Santarem, 2000).

مواد و روش‌ها:

تهیه و استریل کردن بذور و کشت آن:

این آزمایش در آزمایشگاه بیوتکنولوژی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز انجام شد. بذور علف چای (*Hypericum perforatum*) رقم Helos از شرکت ریکترز کانادا تهیه و سپس زیر هود لامینارفلو ابتدا با اتانول ۷۰ درصد به مدت ۲ دقیقه ضدعفونی و سپس به مدت ۲۰ دقیقه با هیپوکلریت سدیم ۲ درصد ضدعفونی گردید. بعد از ضدعفونی سطحی بذور روی محیط کشت MS (Murashige and Skoog, 1962) استریل شده در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار یک اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه، برای جوانه‌زنی قرار داده شد و به دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و شدت نور ۷۰ میکرومول بر متر مربع برثانیه و دمای ۲۵-۲۲°C در اتاق رشد منتقل شدند (شکل ۱).

شکل ۱- بذور کشت شده گل راعی روی محیط MS (A) و گیاهچه ۶ هفته ای گل راعی (B)

کشت ریزنمونه:

ریزنمونه‌های برگی و میان‌گره در ۶ هفتگی از نمونه‌ها جدا و بر روی محیط MS حاوی ویتامین‌های B5 انتقال یافتند. برای تهیه محیط کشت ریز نمونه‌های برگ و میان‌گره ۳۰ گرم در لیتر ساکارز مورد استفاده قرار گرفت. برای مطالعه اثر نانوذرات نقره بر باززایی، غلظت‌های مختلف این نانو ذره (صفر، ۰/۵، ۱، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم در لیتر) به محیط کشت‌های حاوی ترکیب ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر CPPU و ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA و همچنین غلظت‌های مختلف این نانو ذره به محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر CPPU اضافه شدند و ریزنمونه‌های برگ و میان‌گره به این محیط کشت‌ها انتقال یافتند. برای انجام این تحقیق از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار و پنج نمونه در هر تکرار استفاده شد و پس از ۳۰ روز کالوس‌های حاوی شاخساره‌های باززایی شده به ظروف شیشه‌ای حاوی تنظیم کننده‌های فوق انتقال یافته و به دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در اتاق رشد منتقل و بعد از ۱۴ روز طول شاخساره، طول بلندترین شاخساره، تعداد گره بلندترین شاخساره و تعداد شاخساره اندازه گیری شد.

القای ریشه در شاخساره‌ها:

به منظور مطالعه اثر تنظیم کننده‌های رشد بر ریشه‌زایی، شاخساره‌ها بر روی محیط کشت 1/2 MS حاوی تنظیم کننده رشد IBA با غلظت‌های صفر، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر منتقل شدند. هر تیمار دارای ۴ تکرار و هر واحد آزمایشی شامل ۵ ریزنمونه بود. بعد از ۴ روز ارزیابی واحدهای آزمایشی از نظر صفات ریشه‌دهی به صورت روزانه انجام گرفت.

سازگار نمودن گیاهچه‌ها:

گیاهچه‌هایی که در شرایط درون شیشه‌ای رشد کرده بودند، بعد از ریشه‌زایی به پرلیت و ورمی کولایت (۱:۱) منتقل شدند. هنگام انتقال گیاهچه‌ها سعی شد که کمترین تنش مکانیکی و دمایی به آن‌ها وارد شود. برای سازگار شدن گیاهان به محیط گلخانه، روی آنها سلفون کشیده شد تا کاهش بیش از اندازه رطوبت نسبت به شرایط درون شیشه‌ای باعث خشک شدن شاخساره‌ها نگردد. بعد از رشد مناسب ریشه‌ها و سازگار شدن گیاه به محیط گلخانه، گیاهان مورد نظر به خاک گلدان منتقل شدند.

تجزیه آماري:

آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفي با سه تکرار انجام و داده‌ها با استفاده از نرم افزارهای IBM SPSS 22 و MSTATC تجزیه

گردیدند و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌اي دانکن در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت. در پایان نمودارها در محیط Excel رسم شدند.

نتایج و بحث:

تاثیر غلظت‌های مختلف نانو ذرات نقره، نوع تیمار هورمونی و نوع ریزنمونه بر صفات مورد مطالعه

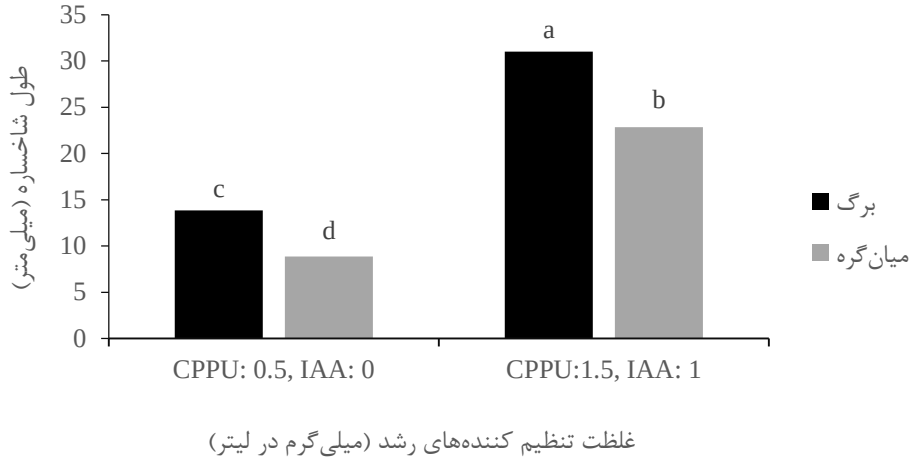
طول شاخساره:

جدول تجزیه واریانس نشان داد که طول شاخساره برای تمام اثرات اصلی، اثرات متقابل و نیز اثرات متقابل سه‌جانبه در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). نتایج این مطالعه نشان داد که بیشترین طول شاخساره با میانگین ۳۱/۰۲ میلی‌متر در تیمار هورمونی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر CPPU و ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA مربوط به ریزنمونه برگ و کمترین آن با میانگین ۸/۸۵ میلی‌متر در تیمار هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر CPPU مربوط به ریزنمونه میان‌گره بود (شکل ۲). در بیشتر مطالعات اولیه در مورد نقش تنظیم کننده‌های رشد روی فرایندهای فیزیولوژیکی در گیاهان، به خصوص در فرایند کشت بافت، توجه بیشتری به اثرات تنظیم‌کننده‌های رشد اضافه شده به محیط کشت نسبت به هورمون‌های درون زاد بافت گیاهی داشتند. گزارش شده است که تعاملاتی بین هورمون‌های گیاهی درون زاد با تنظیم کننده‌های رشد اضافه شده به محیط کشت غذایی وجود دارد (Jimenez, 2001). بنابرین به نظر می‌رسد که علت ایجاد شاخساره در محیط کشت‌های فاقد IAA مربوط به هورمون‌های داخلی ریزنمونه‌ها بود. علاوه بر این نتایج نشان داد که غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات نقره با میانگین ۲۷/۱۱ میلی‌متر در ریزنمونه برگ دارای بیشترین و غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر آن با میانگین ۱۰/۴۶ میلی‌متر در ریزنمونه میان‌گره دارای کمترین طول شاخساره بودند (شکل۳).

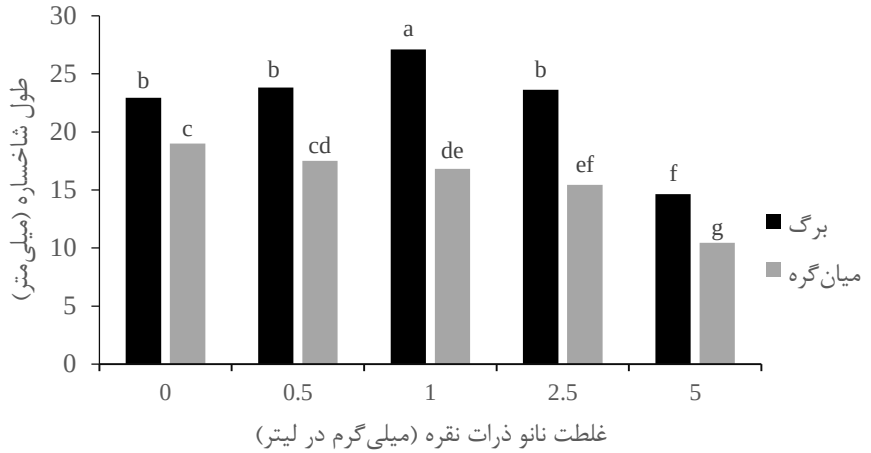
جدول ۱- تجزیه واریانس برخی ویژگی‌های مورد مطالعه گل راعی در سطوح مختلف تیمار هورمونی، ریزنمونه و نانوذرات نقره

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		طول شاخساره	طول بلندترین شاخساره	تعداد گره بلندترین شاخساره	تعداد شاخساره
ریزنمونه	۱	۶۵۱/۲۹**	۱۳۷۹/۰۴۲**	۰/۶۵۳*	۱۶۳۳/۶۵۱**
تیمارهورمونی	۱	۳۶۵۴/۰۹۸**	۶۵۲۱/۸۸**	۳۶/۷۸۵**	۳۱۳۵/۵۰۶**
ریزنمونه×تیمار هورمونی	۴	۳۸/۴۶۴**	۵۷/۸۷۹**	۰/۹۹۳**	۶۷۶/۰۳۳**
نانو ذرات نقره	۱	۱۷۱/۴۶۸**	۳۱۸/۴۴۳**	۷/۳۳۳**	۵۵۶/۰۰۸**
ریزنمونه× نانو ذرات نقره	۴	۲۱/۹۶**	۴۷/۹۷۳**	۰/۱۰۵^{ns}	۱۱/۴۰۵*
تیمار هورمونی×نانو ذرات نقره	۴	۱۱۸/۴۸۳**	۱۷۳/۷۰۵**	۴/۲۱۷**	۱۴۳/۱**
ریزنمونه×تیمارهورمونی×نانو ذرات نقره	۴	۸/۴**	۱۰/۸۱۸^{ns}	۰/۱۶^{ns}	۵/۸۰۹^{ns}
خطا	۴۰	۱/۸۹۴	۵/۳۶۶	۰/۱۳۴	۴/۰۰۵
ضریب تغییرات(CV)		۷/۱۹	۹/۲	۱۳/۴۷	۹/۸۴

ns ، * و ** به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد



شکل ۲- مقایسه میانگین ترکیبات تیماری نوع تیمار هورمونی × نوع ریزنمونه بر طول شاخساره‌های باززایی شده گل راعی (حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد است)

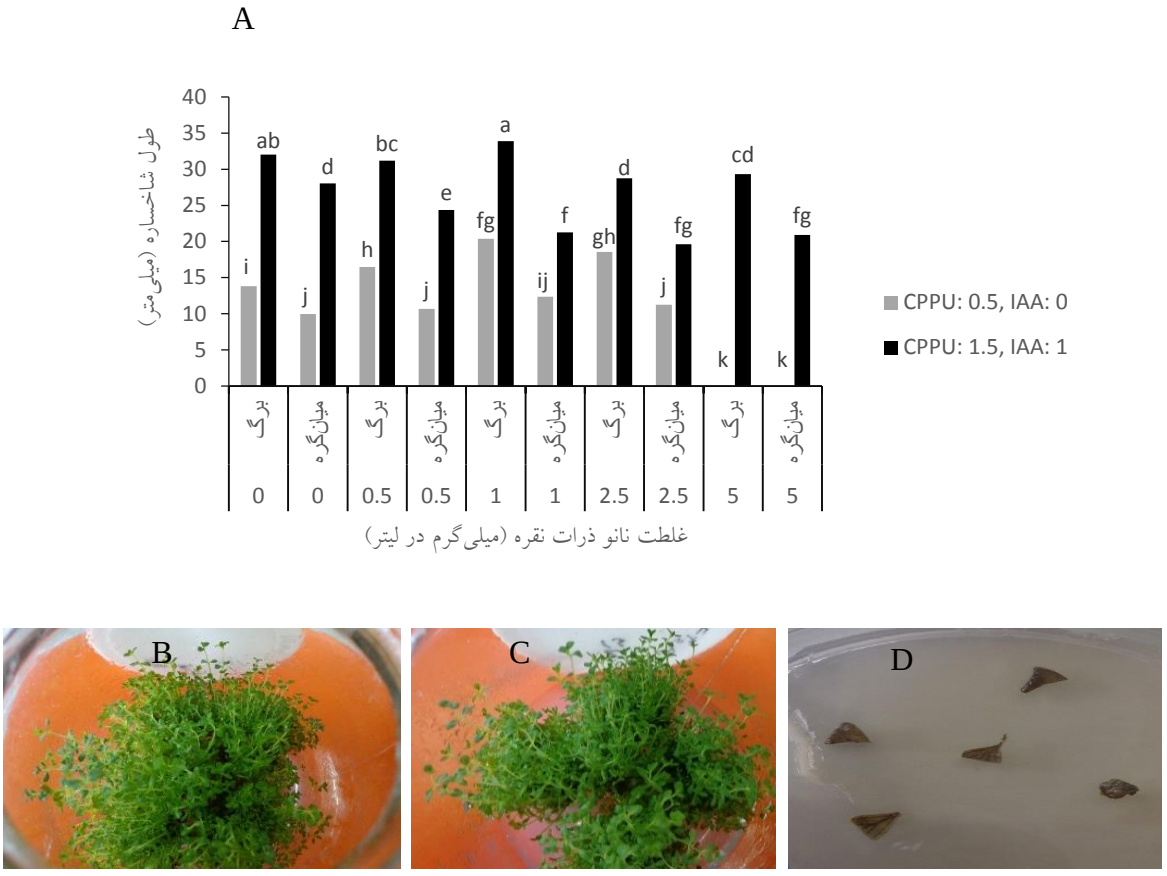


شکل ۳- مقایسه میانگین ترکیبات تیماری نانو ذرات نقره × نوع ریزنمونه بر طول شاخساره‌های باززایی شده گل راعی (حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد است)

علاوه بر این، نتایج این مطالعه نشان داد که غلظت ۱ و صفر میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات نقره به ترتیب با میانگین‌های ۳۳/۸۷ و ۳۲/۰۴ میلی‌متر در تیمار هورمونی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر CPPU و ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA مربوط به ریزنمونه برگ دارای بیشترین طول شاخساره می‌باشد و در غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات نقره در تیمار هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر CPPU در ریزنمونه برگ و میان‌گره شاخساره‌ای روی ریزنمونه‌ها مشاهده نشد (شکل ۴).

این نتایج مشابه یافته‌های تحقیق توسم‌بت و همکاران (۲۰۱۴) است که نشان دادند نانو ذرات نقره در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر باعث کاهش طول شاخساره در گیاه برنج نمی‌شود و بین غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر و صفر میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات نقره تفاوت معنی‌داری از نظر این صفت وجود ندارد. علاوه بر این نتایج مطالعه امیدی و همکاران (۲۰۱۶) نشان داد که بیشترین طول شاخساره در بین ارقام رز مربوط به رقم کاشان در غلظت ۲۵ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات

نقره بود که اختلاف معنی‌داری با شاهد نداشت و در بقیه ارقام، استفاده از نانو ذرات نقره باعث کاهش معنی‌دار طول شاخساره شد. نتایج تحقیقات مختلف نشان دهنده این است که نانو ذرات نقره بسته به نوع گیاه و در تعامل با سایر عوامل ممکن است در غلظت‌های خاص باعث افزایش یا کاهش رشد گیاه شود. علت این امر شاید مربوط به افزایش محتویات پرولین کل باشد که توسط نانو ذرات تحت شرایط تنش درسلول‌های گیاهی تولید می‌شود. پرولین ماده‌ای است که تحت شرایط استرس در سلول‌های گیاهی تولید می‌شود و در غلظت‌های بالا می‌تواند سلول‌های گیاهان را از وارد شدن به شرایط نامطلوب نجات دهد.همچنین اضافه نمودن نانو ذرات باعث افزایش فعالیت آنزیم‌هایی مثل پراکسیداز، کاتالاز و نیترات ردوکتاز می‌شود که باعث بهبود باززایی می‌شود (Anwaar et al., 2016). علاوه بر این سایر مکانیسم‌های ناشناخته نانوذرات نقره که اثرات بازدارندگی رشد آن را جبران می‌کند ممکن است از عوامل دیگر تاثیرات مثبت نانو ذرات نقره در غلظت‌های خاص باشد (Thuesombat et al., 2014).

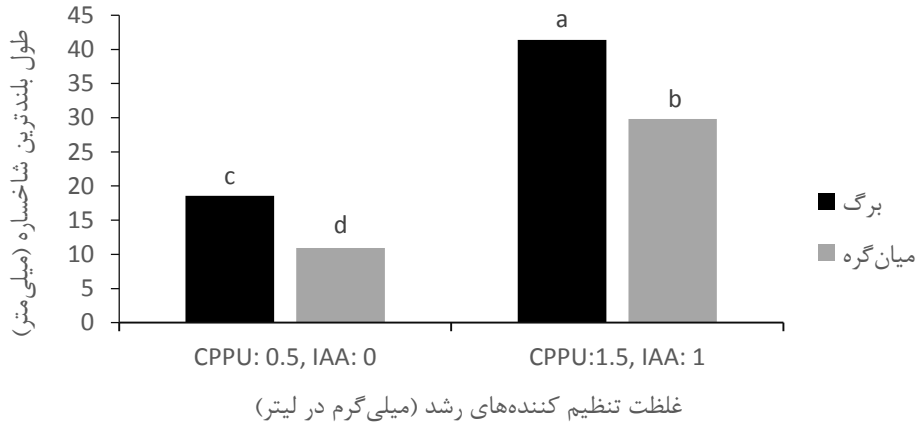


شکل ۴- مقایسه میانگین ترکیبات تیماری نانو ذرات نقره × نوع ریزنمونه × تیمار هورمونی بر طول شاخساره‌های باززایی شده در گل راعی (حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد است) (A). ریزنمونه برگ گل راعی در تیمار هورمونی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر CPPU و ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA و فاقد نانو ذرات نقره (B) و ۱ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات نقره (C) و در تیمار هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر CPPU و حاوی ۵ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات نقره (D) ۴۴ روز بعد کشت.

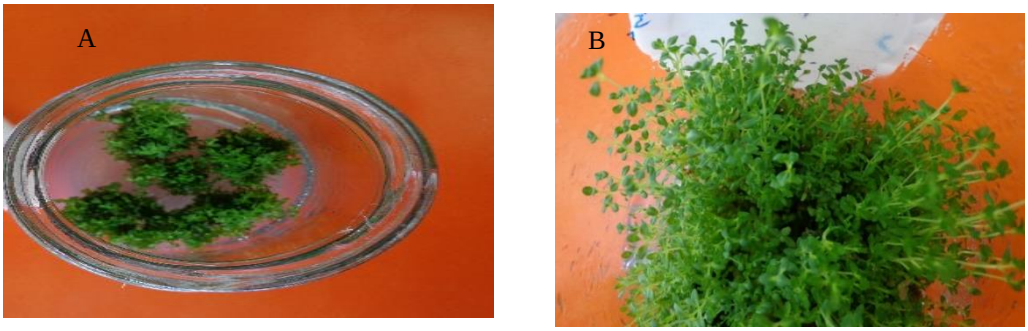
طول بلندترین شاخساره

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که طول بلندترین شاخساره برای تمامی اثرات اصلی و متقابل دو جانبه در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). نتایج این مطالعه نشان داد که

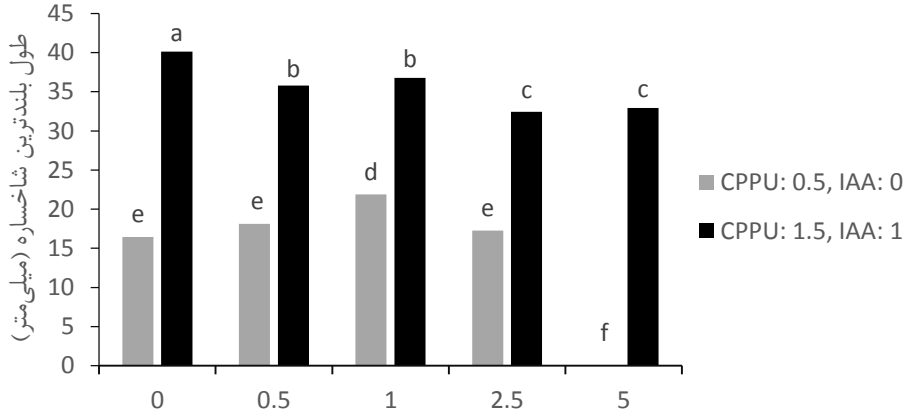
بیشترین طول در بلندترین شاخساره با میانگین ۴۱/۳۷ میلی‌متر مربوط به ریزنمونه برگ در تیمار هورمونی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر CPPU و ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA و کمترین طول بلندترین شاخساره با میانگین ۱۰/۹۳ میلی‌متر مربوط به ریزنمونه میان‌گره در تیمار هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر CPPU بود (شکل ۵). باتوجه به اینکه سیتوکینین تغییراتی را در نسخه برداری، ثبات mRNA یا ترجمه القا می‌کند و باعث نمو بیشتر جوانه می‌شود و برای رشد بیشتر جوانه‌ها نیاز به حضور اکسین می‌باشد (Taiz and Zeiger, 2010). براین اساس مشاهده می‌شود که CPPU به‌همراه IAA نقش موثرتری در افزایش طول بلندترین شاخساره در گیاه گل راعی دارد (شکل ۶). همچنین غلظت صفر میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات نقره با میانگین ۴۰/۱۱ دارای بیشترین طول در بلندترین شاخساره در تیمار هورمونی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر CPPU و ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA بود و در غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات نقره در تیمار هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر CPPU شاخساره‌ای مشاهده نشد (شکل ۷).



شکل ۵- مقایسه میانگین ترکیبات تیماری CPPU × نوع ریزنمونه بر طول بلندترین شاخساره در گل راعی
(حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد است)



شکل ۶- ریزنمونه برگ کشت شده در محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر CPPU (A) و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر CPPU به‌همراه ۱میلی‌گرم در لیتر IAA (B).

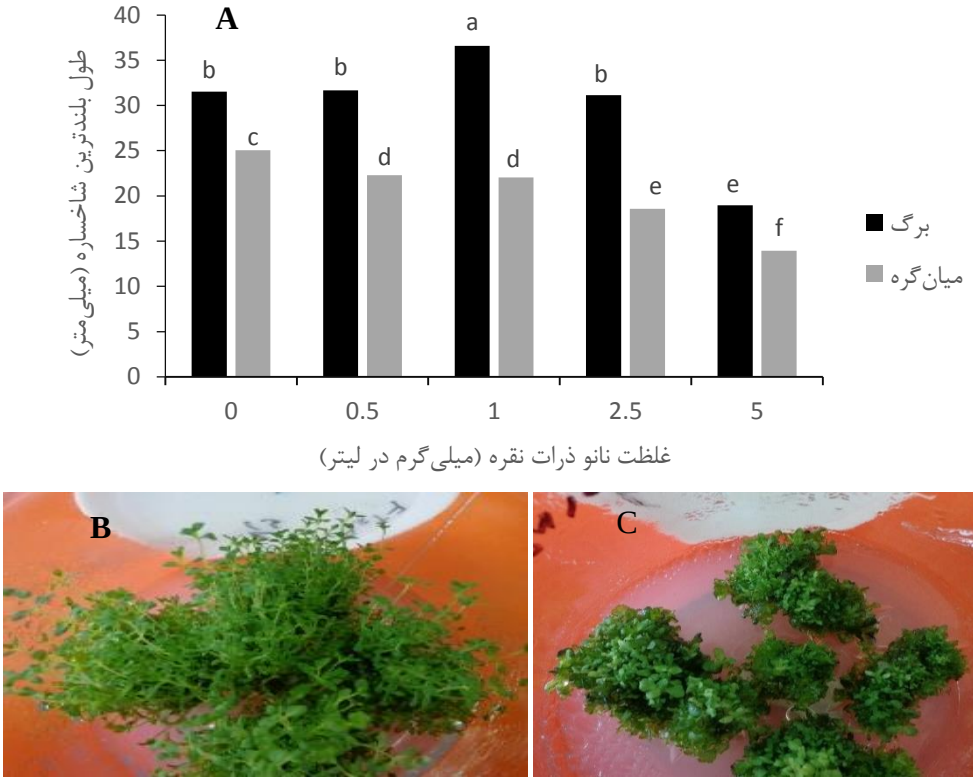


شکل ۷- مقایسه میانگین ترکیبات تیماری نانو ذرات نقره × نوع تیمار هورمونی بر طول بلندترین شاخساره‌های باززایی شده در گل راعی (حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد است)

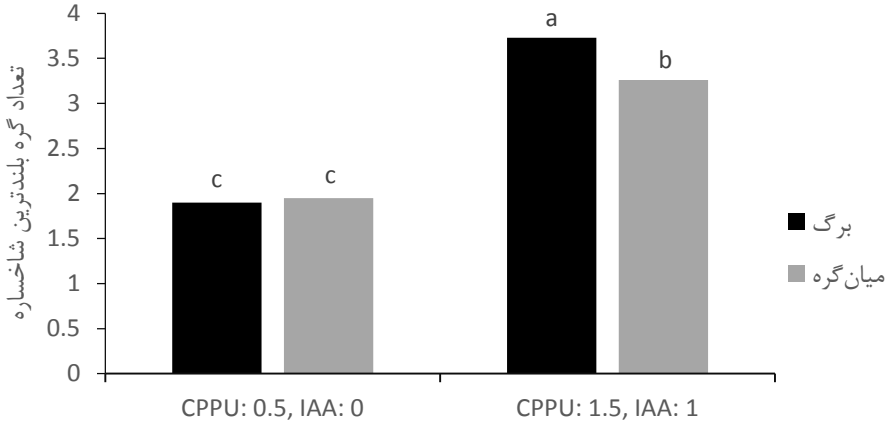
علاوه بر این، نتایج نشان داد که شاخساره‌ها در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات نقره با میانگین ۳۶/۵۸ میلی‌متر در ریزنمونه برگ دارای بیشترین طول در بلندترین شاخساره و در غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات نقره با میانگین ۱۳/۹۵ میلی‌متر در ریزنمونه میان‌گره دارای کمترین طول در بلندترین شاخساره بودند (شکل ۸). چنین به نظر می‌رسد که اثرات بازدارندگی از رشد، ناشی از جذب و انتقال نانو ذرات نقره در بافت گیاهان می‌باشد (Thuesombat et al., 2014). همچنین توسم‌بت و همکاران (Thuesombat et al., 2014) نشان دادند که استفاده از غلظت‌های مختلف نانو ذرات نقره در محیط کشت باعث کاهش طول شاخساره در گیاه برنج می‌شود. در این مطالعه بلندترین شاخساره در تیمار شاهد و محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات نقره مشاهده شد و در سایر تیمارها حتی در غلظت‌های پایین نانو ذرات نقره (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) کاهش رشد شاخساره مشاهده شد.

تعداد گره بلندترین شاخساره:

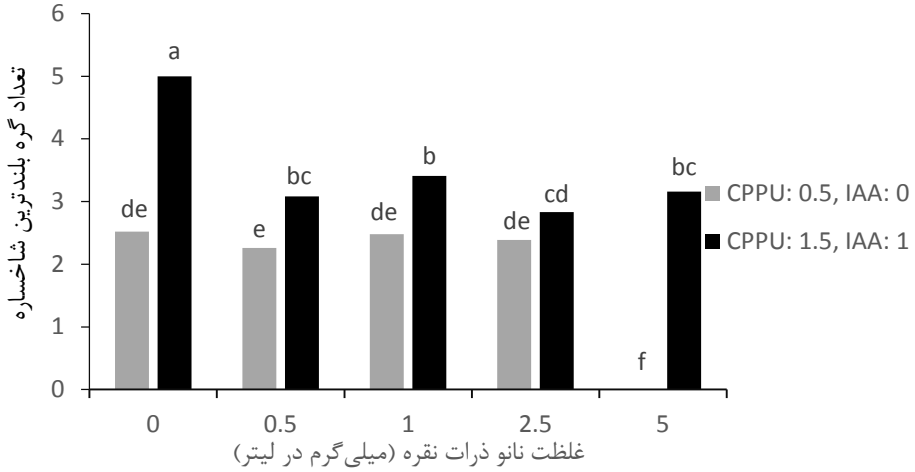
نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر نوع تیمار هورمونی و نانوذرات نقره و نیز اثرات متقابل دو جانبه برای تعداد گره بلندترین شاخساره در سطح احتمال ۱ و اثر اصلی نوع ریزنمونه در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). نتایج این مطالعه نشان داد که ریزنمونه برگ در تیمار هورمونی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر CPPU و ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA با میانگین ۳/۷۳ بیشترین و ریزنمونه برگ و میان‌گره در تیمار هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر CPPU به ترتیب با میانگین‌های ۱/۹ و ۱/۹۵ کمترین تعداد گره را در بلندترین شاخساره داشتند (شکل ۹). همچنین، نتایج نشان داد که غلظت صفر میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات نقره با میانگین ۵ گره، در تیمار هورمونی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر CPPU و ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA دارای بیشترین تعداد گره در بلندترین شاخساره بود و در غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات نقره درتیمار هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر CPPU شاخساره‌ای مشاهده نشد و ریزنمونه‌ها بعد از ۲ هفته از بین رفتند (شکل ۱۰).



شکل ۸- مقایسه میانگین ترکیبات تیماری نانو ذرات نقره × نوع ریزنمونه بر طول بلندترین شاخساره‌های باززایی شده در گل راعی (حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد است) (A). ریزنمونه برگ گل راعی در تیمار هورمونی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر CPPU و ۱میلی‌گرم در لیتر IAA به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات نقره (B) و میان‌گره روی همان محیط کشت به همراه ۵ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات نقره (C) ۴۴ روز بعد از کشت



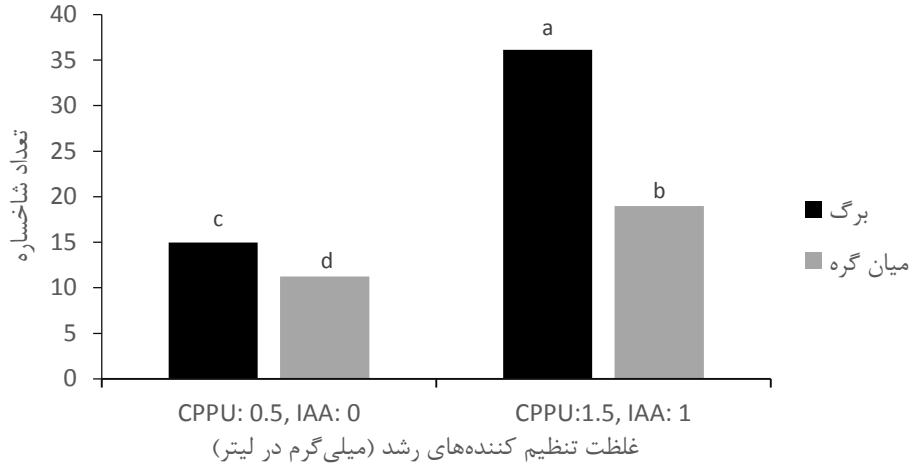
شکل ۹- مقایسه میانگین ترکیبات تیماری ریزنمونه × نوع تیمار هورمونی در تعداد گره بلندترین شاخساره‌های باززایی شده در گل راعی (حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد است)



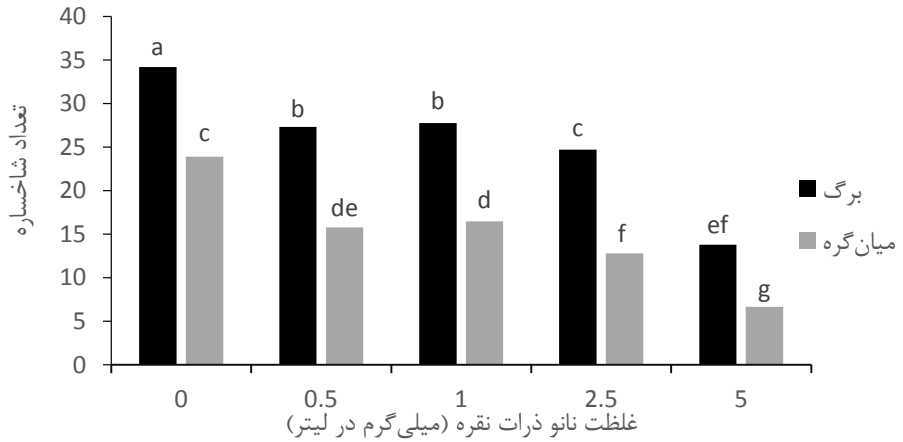
شکل۱۰- مقایسه میانگین ترکیبات تیماری نانو ذرات نقره × نوع تیمار هورمونی در تعداد گره بلندترین شاخساره‌های باززایی شده در گل راعی (حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد است)

تعداد شاخساره:

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرات ریزنمونه، نوع تیمار هورمونی و نانو ذرات نقره و اثرات متقابل ریزنمونه × نوع تیمار هورمونی، نوع تیمار هورمونی × نانو ذرات نقره و ریزنمونه × نانو ذرات نقره در سطح احتمال ۱ درصد و همچنین اثر متقابل ریزنمونه × نانو ذرات نقره در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). نتایج این مطالعه نشان داد که ریزنمونه برگ در تیمار هورمونی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر CPPU و ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA با میانگین ۳۶/۱۳ بیشترین و ریزنمونه میان‌گره در تیمار هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر CPPU با میانگین ۱۱/۲۴ کمترین تعداد شاخساره را در هر ریزنمونه داشت (شکل ۱۱). این یافته با نتایج مطالعات آیان و همکاران (۲۰۰۵) همخوانی داشت زیرا این محققین نشان دادند که تعداد شاخساره‌های باززایی شده از ریزنمونه برگ به طور معنی‌دار بالاتر از ریزنمونه ساقه در گیاه گل راعی است. علاوه بر این نتایج مقایسه میانگین نشان داد که غلظت صفر میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات نقره با میانگین ۳۴/۱۹ مربوط به ریزنمونه برگ بیشترین و غلظت ۵ میلی‌گرم در لیترآن با میانگین ۶/۶۶ مربوط به ریزنمونه میان‌گره کمترین تعداد شاخساره را داشت (شکل ۱۲). ویلیامز و همکاران (۱۹۹۰) نیز نشان دادند که غلظت‌های بالای نیترات نقره (۳ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر) در ارقام Gower و Tornado گیاه کلم تکمه‌ای به‌عنوان بازدارنده شاخه‌زایی عمل می‌کند و باززایی با افزایش غلظت نیترات نقره کاهش می‌یابد.

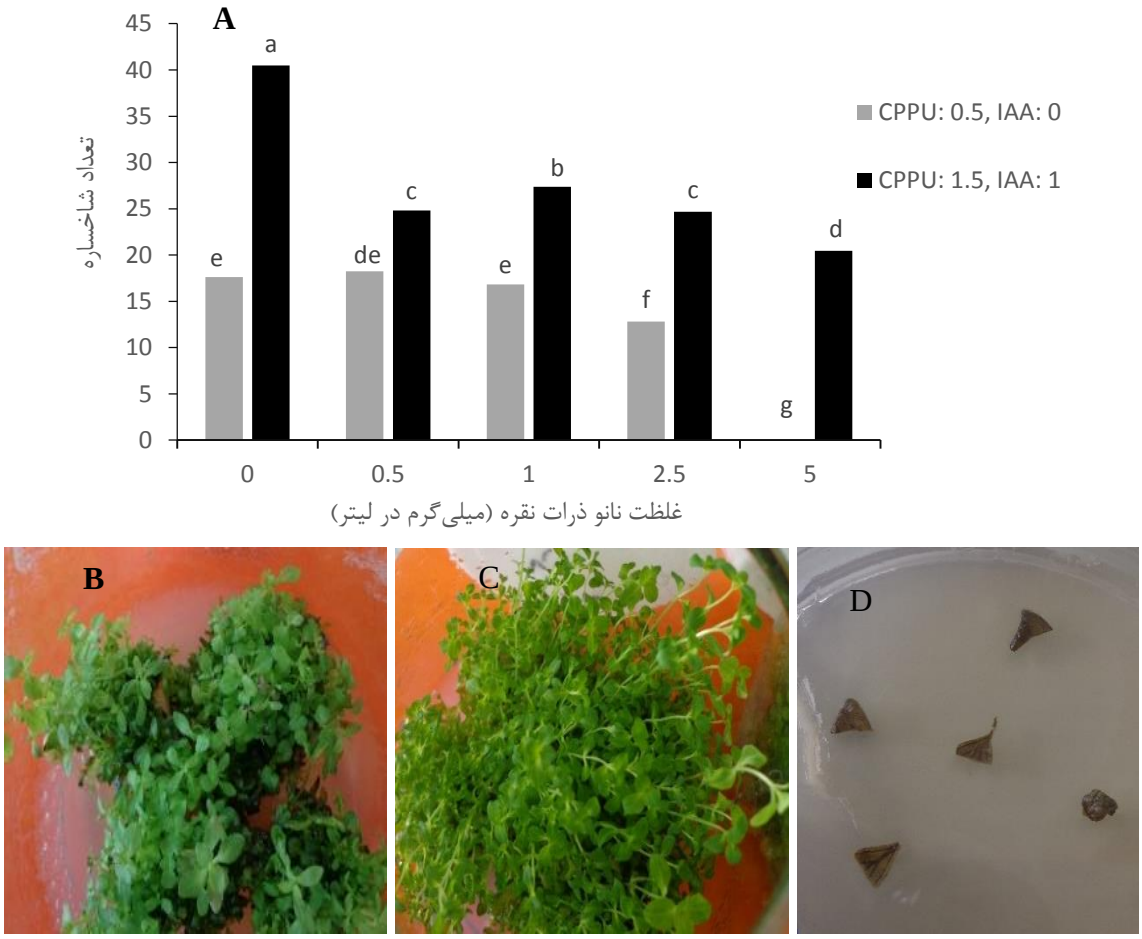


شکل۱۱- مقایسه میانگین ترکیبات تیماری نوع تیمار هورمونی × نوع ریزنمونه بر تعداد شاخساره‌های باززایی شده در گل راعی(حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد است)



شکل۱۲- مقایسه میانگین ترکیبات تیماری نانو ذرات نقره × ریزنمونه بر تعداد شاخساره‌های باززایی شده در گل راعی (حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد است)

همچنین غلظت صفر میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات نقره با میانگین ۴۰/۴۸ در تیمار هورمونی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر CPPU و ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA دارای بیشترین تعداد شاخساره در ریزنمونه‌ها بود و در غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات نقره در تیمار هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر CPPU شاخساره‌ای در ریزنمونه‌ها مشاهده نشد و ریزنمونه‌ها بعد از ۲ هفته از بین رفتند (شکل۱۳). این یافته با گزارش نیلانتی و یانگ (۲۰۱۴) همخوانی دارد. براساس مشاهدات آنها غلظت‌های بالای نیترات نقره بازدارنده رشد گیاهان بود، به‌طوری که بیشترین میزان شاخه‌زایی گیاه سرخار گل در تیمار شاهد مشاهده گردید ولی در غلظت‌های پایین نیترات نقره (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) نیز شاخه زایی به طور معنی‌داری کاهش یافت.



شکل۱۳- مقایسه میانگین ترکیبات تیماری نانو ذرات نقره × نوع تیمار هورمونی بر تعداد شاخساره‌های باززایی شده در گل راعی (حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد است) (A). ریزنمونه برگ گل راعی در تیمار هورمونی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر CPPU و ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA به همراه ۵ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات نقره (B) و فاقد نانو ذرات نقره(C) و در تیمار هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر CPPU به‌همراه ۵ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات نقره(D)

تاثیر غلظت‌های مختلف IBA بر ریشه‌زایی گیاه دارویی گل راعی

نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس نشان داد که IBA برای تمامی صفات در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول۲).

جدول ۲- تجزیه واریانس ریشه در غلظت های مختلف IBA گل راعی

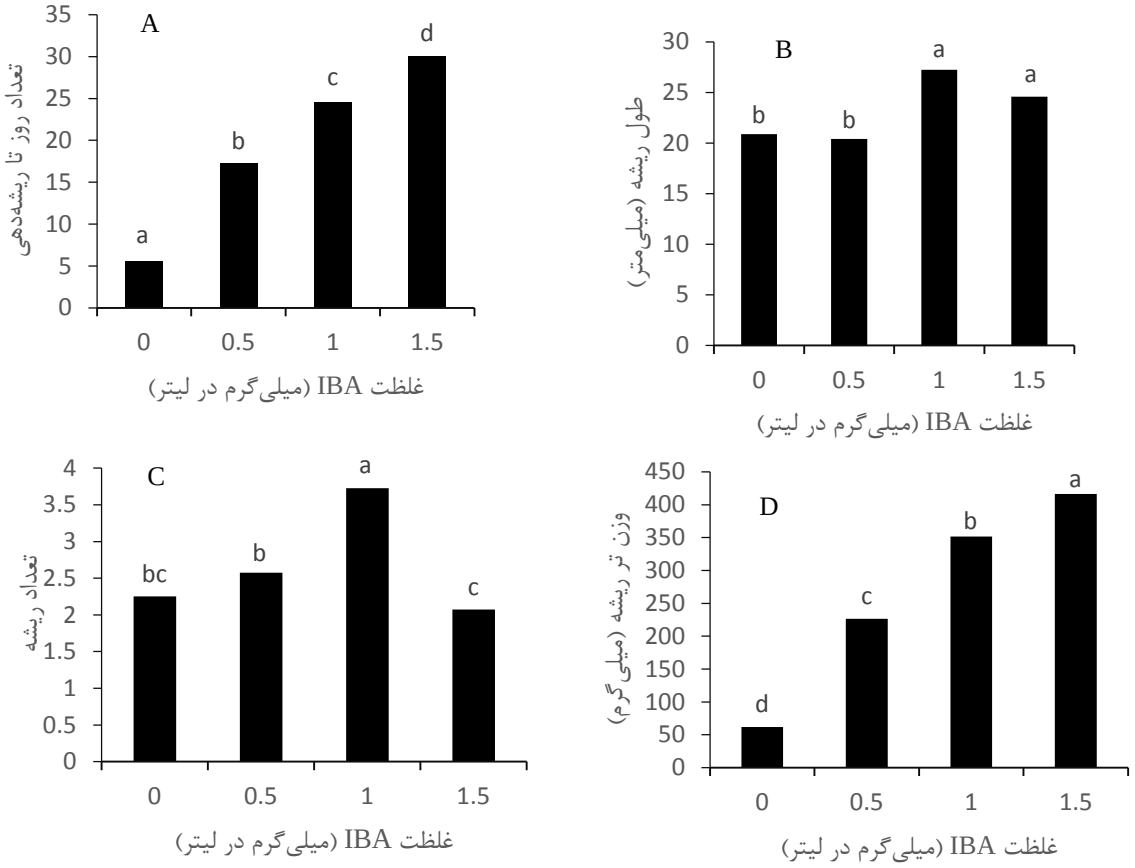
منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		تعداد روز تا ریشه‌دهی	طول ریشه	تعداد ریشه	وزن تر ریشه
IBA	۳	۴۴۸/۲۲**	۴۱/۶۷**	۲/۲**	۹۷۵۹۲/۰۹**
خطا	۱۲	۴/۳۹	۴/۰۱	۰/۰۶۳	۲۶۴/۸۳
ضریب تغییرات (CV)		۱۰/۸۶	۸/۶۱	۹/۴۱	۶/۱۶

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که کمترین تعداد روز تا ریشه‌دهی با میانگین ۵/۵ روز مربوط به شاخساره‌هایی که روی محیط کشت فاقد IBA و بیشترین تعداد روز تا ریشه‌دهی با میانگین ۳۰ روز مربوط به شاخساره‌هایی که روی محیط کشت حاوی۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA قرار گرفته بودند، می‌باشد. همچنین شاخساره‌ها روی محیط کشت‌های حاوی ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA به ترتیب با میانگین‌های ۲۷/۲۵ و ۲۴/۵۷ میلی‌متر دارای بیشترین و در محیط کشت های حاوی صفر و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA به ترتیب با میانگین‌های ۲۰/۹ و ۲۰/۴۲ میلی‌متر دارای کمترین طول ریشه هستند. نتایج این یافته نشان داد که شاخساره‌ها روی محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA با میانگین ۳/۷۲ دارای بیشترین و در محیط کشت‌های حاوی صفر و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر آن به ترتیب با میانگین‌های ۲/۲۵ و۲/۰۷ دارای کمترین تعداد ریشه بودند. این نتایج مشابه نتایج آزمایشات پرتو و سانتارم (۲۰۰۰) می‌باشد که نشان دادند بالاترین شمار ریشه در هر شاخساره در محیط کشت پایه 1/2 MS و غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA حاصل می‌شود. انجام مقایسه میانگین نشان داد که شاخساره‌های علف چای در غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA با میانگین ۴۱۶/۳۷ میلی‌گرم دارای بیشترین و در غلظت صفر میلی‌گرم در لیتر IBA با میانگین ۶۱/۷ میلی‌گرم دارای کمترین وزن تر ریشه بودند (شکل ۱۴).

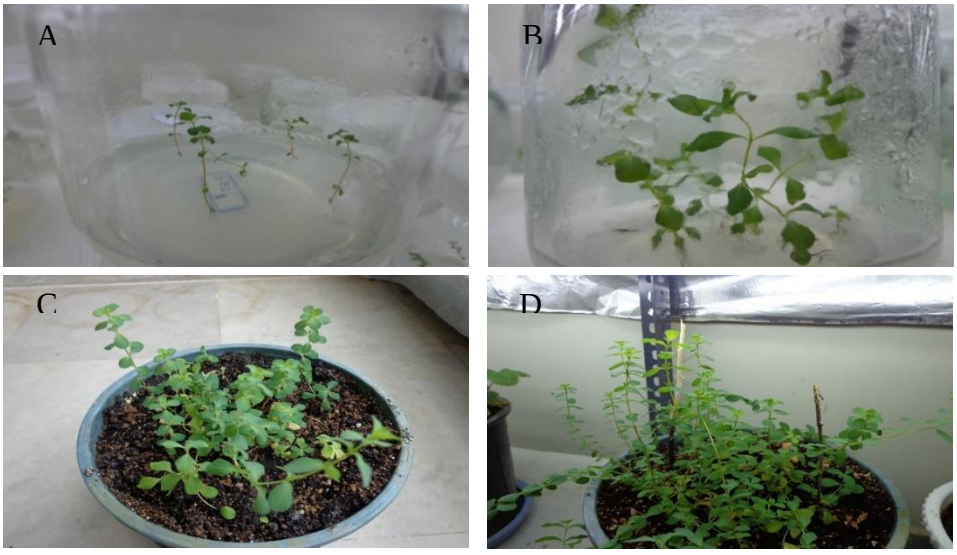
سازگار نمودن گیاهچه‌ها و انتقال آن‌ها:

گیاهچه‌هایی که در شرایط درون شیشه‌ای رشد کرده بودند، بعد از ریشه‌زایی ابتدا به پرلیت و ورمی کولایت (۱:۱) و در نهایت به خاک منتقل شدند. برای سازگار شدن گیاهان به محیط گلخانه روی آنها پلاستیک کشیده شد تا کاهش بیش از اندازه رطوبت نسبت به شرایط درون شیشه‌ای باعث خشک شدن شاخساره‌ها نگردد با این کار می‌توان رطوبت نسبی را در حد بالایی حفظ نمود. بعد از رشد مناسب ریشه‌ها و سازگار شدن گیاه به محیط گلخانه، گیاهان مورد نظر به خاک گلدان منتقل شدند. همه گیاهان انتقال داده شده از محیط کشت درون شیشه‌ای به خاک به نحو مطلوبی رشد نمودند و زنده ماندند. (شکل ۱۵).



شکل ۱۴- مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف IBA بر تعداد روز تا ریشه‌دهی (A)، طول ریشه (B) ، تعداد ریشه (C) و وزن تر ریشه (D) در گل راعی

(حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد است)



شکل ۱۵- شاخساره‌های باززایی شده از ریزنمونه برگ روی محیط 1/2 MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بعد از ۷ روز (A) و بعد از ۴۴ روز (B) انتقال شاخساره‌ها به پرلیت و ورمی کولایت (۱:۱) (C وD)

نتیجه‌گیری:

نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان می‌دهد که تیمار هورمونی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر CPPU در ترکیب با ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA موثرترین تیمار هورمونی در افزایش باززایی گل راعی می‌باشد و این غلظت به عنوان غلظت بهینه برای استفاده در کارهای مولکولی و بیوتکنولوژی پیشنهاد می‌گردد. از بین ریزنمونه برگ و میان‌گره، ریزنمونه برگ ریزنمونه مناسبی در افزایش باززایی گل راعی می‌باشد. همچنین استفاده از نانو ذرات نقره در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر باعث ایجاد برخی صفات مثبت مثل افزایش طول شاخساره در گل راعی می‌شود.

منابع:

Abdi, G., Salehi, H. and Khosh-Khui, M. (2008). Nano silver: a novel nanomaterial for removal of bacterial contaminants in valerian (*Valeriana officinalis* L.) tissue culture. Acta Physiologiae Plantarum, 30, 709-71

Anwaar, S., Maqbool, Q., Jabeen, N., Nazar, M., Abbas, F., Nawaz, B., Hussain, T. and Hussain, S.Z. (2016). The effect of Green synthesized CuO Nanoparticles on callogenesis and regeneration of *Oryza sativa* L. Frontiers in Plant Science, 7, 1330.

Ayan, A.K., Çirak, C., kevseroglu, K. and Sökmen, A. (2005). Effects of explant types and different concentrations of sucrose and phytoharmones on plant regeneration and hypericin content in *Hypericum perforatum* L. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 29, 197-204.

Cardoso, M. and De oliveira, D. (1996). Tissue culture of *Hypericum brasiliense* Choisy: Shoot multiplication and callus induction. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 44, 91-94.

Chawla, H. (2002). Introduction to plant biotechnology. science Publishers,U.S.

Gaspar, T., Kevers, C., Penel, C., Greppin, H., Reid, D.M. and Thorpe, T.A. (1996). Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant, 32, 272-289.

Hojjat, S.S. and Hojjat, H. (2015). Effect of Nano Silver on Seed Germination and Seedling Growth in Fenugreek Seed. International Journal of Food Engineering, 1, 1-5.

Jimenez, V.M. (2001). Regulation of in vitro somatic embryogenesis with mphasis on the role of endogenous hormones. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, 13, 196-223

Klemow, K., Bilbow, E., Grasso, D., Jones, K., Mcdermott, J. and Pape, E. (2004). Medical of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*).Oxidative Stress and Disease Attributes, 14, 757-780.

Lin, D. and Xing, B. (2007). Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. Environmental Pollution, 150, 243-250.

Liu, M.G., Oqiwara, I., Hakoda, N. and Shimura, I. (1994). Effects of BA, TDZ and CPPU on formation of adventitious shoots from callus derived from apple cotyledon. Journal of the American Society for Horticultural Science, 63, 505-514.

Mahna, N., Vahed, S.Z. and Khani, S. (2013). Plant in vitro culture goes nano: nanosilver-mediated decontamination of ex vitro explants. Journal of Nanomedicine and Nanotechnology, 4, 1-4

Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15, 473-497.

Nilanthi, D. and Yang, Y.S. (2014). Effects of Sucrose and Other Additives on In Vitro Growth and Development of Purple Coneflower (*Echinacea purpurea* L.). Advances in Biology, 2014, 1-4.

Omidi, M., Yadollahi, A. and Eftekhari, M. (2016). Comparative study of Rosa damascenes Mill. and R. Gallica micro-propagation. Biological Forum, 8(1), 135-145

Pretto, F.R. and Santarem, E.R. (2000). Callus formation and plant regeneration from Hypericum perforatum leaves. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 62, 107-113.

Ricci, A. and Bertoletti, C. (2009). Urea derivatives on the move: cytokinin-like activity and adventitious rooting enhancement depend on chemical structure. Plant Biology, 11, 262-272.

Saddiqe, Z., Naeem, I. and Maimoona, A. (2010). A review of the antibacterial activity

Thuesombat, P., Hannongbua, S., Akasit, S. and Chadchawan, S. (2014). Effect of silver nanoparticles on rice (*Oryza sativa* L. cv. KDML 105) seed germination and seedling growth. Ecotoxicology and Environmental Safety, 104, 302-309.

Tsuro, M., Koda, M. and Inoue, M. (1999). Comparative effect of different types of cytokinin for shoot formation and plant regeneration in leaf-derived callus of lavender (*Lavandula vera* DC). Scientia Horticulturae, 81, 331-336.

Williams, J., Pink, D.A.C. and Biddington, N.L. (1990). Effect of silver nitrate on long-term culture and regeneration of callus from *Brassica oleracea* var. *gemmifera*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 21, 61-66.

of. *Hypericum perforatum* L. Journal of Ethnopharmacology, 131, 511-521.

Santarém, E.R. and Astarita, L.V. (2003). Multiple shoot formation in *Hypericum perforatum* L. and hypericin production. Brazilian Journal of Plant Physiology, 15, 43-47.

Scott, N., Chen, H. and Rutzke, C.J. (2003). Nano scale science and engineering for agriculture and food systems, National Planting Workshop, Washington.

Seifsahandi, M., Sorooshzadeh, A., Rezazadeh, H. and Naghdibadi, H. (2011). Effect of nano silver and silver nitrate on seed yield of borage. Journal of Medicinal Plants Research. 5, 706-710.

Taiz, L. and Zeiger, E. (2010). Plant physiology. Sinauer Associates Inc Publishers Sunderland Massachusetts, 5th Ed. U.S.A, Pp 545-640

Journal of Medicinal Plants Biotechnology
Vol 4, No 1, Spring & Summer 2018

Regeneration in St. John's wort (*Hypericum perforatum*): Interaction of Silver N anoparticles with Other Factors

Mehdi Soltanpour[1], Nasser Mahna[1] and Nader Farsad Akhtar[2]

Abstract

St. John's wort is a perennial flowering plant with valuable medicinal properties. In vitro systems are an important tool for obtaining uniform genetic plants that can be valuable sources of pharmaceutical products. Our aim in this research was to develop a more efficient regeneration protocol for this plant applicable in genetic engineering programs. To do this, the effects of different concentrations of silver nanoparticles (0, 0/5, 1, 2/5 and 5 mg/l) and its interaction with plant growth regulators as well as explants on shoot regeneration of *Hypericum perforatum* leaf and stem segment explant were evaluated, in a CRD-based factorial design with three replicates and five samples in each replicate under *in vitro* conditions. Based on the results, 1.5 mg / L of CPPU (N-(2-Chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea) and 1 mg / L of IAA was the most suitable hormonal combination for *Hypericum perforatum* regeneration. Silver nanoparticles at 1 mg / L concentration caused some positive effects such as increasing length in regenerated shoots from *Hypericum perforatum* leaf explants, but higher concentrations of nano silver (5 mg / L) caused a significant reduction in regeneration. Furthermore, the shoots regenerated from *Hypericum perforatum* leaf explants showed a better rooting on 1/2 MS medium containing 1 mg/l IBA.

Keywords: St. John's wort, N-(2-Chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea, Indole acetic acid, Regeneration, Silver nanoparticle

[1] Department of Horticulture, University of Tabriz, Iran. *Coresponding author, Email: mehdisoltanpour67@gmail.com
[2] Department of Biology, University of Tabriz, Iran