تأثیر نانوذرات کربنی بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی سیب گوشت قرمز و مالینگ مرتون

مریم عبدالعلی‌پور[۱*]، محمدرضا دادپور[۲]، باقر افتخاری سیس[۳]، علیرضا مطلبی‌آذر[۴]

۱*-دانشجوی دکتری ، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۲-دانشیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۳- استاد تمام، دانشکده شیمی، دانشگاه مراغه، مراغه

۴- دانشیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

*ایمیل نویسنده مسئول: mary.abdolalipor@gmail.com

تاریخ دریافت : ۱۴۰۰/۰۹/۲۷ تاریخ پذیرش : ۱۴۰۰/۱۱/۰۹

چکیده

ریزازدیادی نقش مهمی در تولید گیاهان سالم با ویژگی‌های مطلوب در گیاه سیب دارد. استفاده از نانوذرات کربنی تأثیر چشمگیری بر افزایش رشد و جوانه‌زنی گونه‌های مختلف گیاهی در شرایط درون شیشه‌ای داشته است. پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر تیمار نانوذرات مختلف بر پرآوری ریزنمونه-های دو ژنوتیپ سیب گوشت قرمز و مالینگ مرتون ۱۰۶ انجام گردید. نانو ذرات مورد استفاده شامل نانو تیوب کربنی چند دیواره و گرافن اکسید در ۳ غلظت ۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر بود. جهت بررسی نحوه ورود و محل تجمع نانو ذرات در گیاه، از میکروسکوب فلورسنس استفاده شد. بر اساس نتایج حاصل نانوتیوب کربن و گرافن اکسید اثر مثبتی بر پرآوری در هر دو نوع سیب داشته است و با افزایش تعداد برگ و طول میانگره موجب بهبود پرآوری ریزنمونه‌های تیمار شده نسبت به شاهد گردیدند. تیمار نانوذرات با کاهش پلاستوکرون، سرعت رشد و تولید برگ را افزایش دادند. در این بررسی نفوذ هر دو ترکیب نانوذرات در بافت‌های گیاهان مورد مطالعه مشاهده گردید. مقایسه اثرات تیمارهای نانو ذرات، بیانگر این است که اثر مثبت گرافن اکسید بر پرآوری ریزنمونه‌های هر دو ژنوتیپ سیب بیشتر از نانوتیوب کربن بود.

کلمات کلیدی

"سیب گوشت قرمز"، "گرافن اکسید"، "نانوتیوب کربن"، "مالینگ مرتون"،

۱- مقدمه

افزایش روزافزون جمعیت جهان و کاهش منابع غذایی، استفاده از روش‌های جدید و سودمند را برای تولید بیشتر و بهتر محصولات گیاهی، با حفظ محیط زیست، اجتناب‌ناپذیر کرده است. روش‌های گوناگونی برای ازدیاد رویشی پایه‌های مختلف سیب بکار گرفته می‌شوند که می‌توان بهره‌گیری از قلمه، خوابانیدن و پیوند جوانه را نام برد. این روش‌ها وابسته به فصل بوده و نیاز به نیروی انسانی، زمان و فضای زیاد دارند. علاوه بر این در این روش‌ها اطمینانی به تولید گیاهان سالم و عاری از بیماری نیست. کلید موفقیت در هر برنامه کشت تجاری، بستگی به در دسترس بودن شمار زیاد پایه‌های پیوندی دارد. ریزازدیادی روش مهم دیگری برای ازدیاد پایه‌های درختان میوه به‌ویژه سیب به شمار می‌آید که تکثیر آن‌ها با روش‌های سنتی مشکل است. در روش ریزازدیادی، فرآیندهای مختلف اندام‌زایی مانند ریشه‌زایی با سرعت بالا صورت می‌گیرد که می‌توان شمار بالایی از گیاهان را در فضایی کم و مدت زمان مناسب بدست آورد. ریزازدیادی برای تولید تجاری بسیاری از پایه‌ها و کولتیوارهای پیوندی درختان میوه مانند گیلاس، انگور و سیب با موفقیت بکار گرفته شده است (Sun et al., 2014). با توجه به اهمیت تجاری درخت سیب، تکثیر این گیاه به روش ریزازدیادی نقش مهمی در تولید گیاهان کلونال عاری از بیماری و توسعه احداث باغ‌های متراکم سیب دارد (Dobránszki and Silva. 2010). کلون‌های مشابه[1] در ریزازدیادی پایه‌های سیب یک پیش‌شرط مهم است (Modgil et al., 2005). با این وجود، ریزازدیادی برخی از کولتیوارهای سیب در مرحله پرآوری کم بازده بوده و توجیه اقتصادی بهره‌گیری این روش را جهت تکثیر کاهش می‌دهد. با این‌حال برای پیشبرد فرآیند تولید گیاهان تراریخته، حفظ ژرم‌پلاسم و تولید متابولیت های ثانویه، بکارگیری روش‌های درون‌شیشه‌ای تنها گزینه خواهد بود (Shi et al., 2017). کارآمدی در کشت‌های درون شیشه‌ای، نیازمند افزایش سرعت اندام‌زایی و پرآوری ریزشاخساره‌ها است که به تولید گیاهان کامل منتج می‌شوند. در کولتیوارهایی که سرعت کندی در اندام‌زایی دارند، استفاده از روش‌هایی که پرآوری ریزنمونه‌های شاخساره را برای دستیابی به شمار فراوانی از ریزقلمه فراهم می‌آورند، ضروری می‌باشد (Geng et al., 2015). سیب گوشت قرمز، ژنوتیپی با ارزش از گروه سیب‌های دارای آنتوسیانین بالا بشمار می‌آید که در خطر انقراض قرار دارد و تنها چند پایه از آن باقی مانده است. بررسی‌های اولیه انجام شده بر کشت درون شیشه‌ای سیب گوشت قرمز در آزمایشگاه کشت بافت گروه باغبانی دانشگاه تبریز، بیانگر سرعت کند پرآوری این ژنوتیپ است. با توجه به اهمیت سیب گوشت قرمز از دیدگاه باغبانی و بازار مصرف (Zhang et al., 2020) و از سوی دیگر پتانسیل این ژنوتیپ برای بهنژادی و معرفی رقم جدید، بررسی روش‌های بهبود ازدیاد درون‌شیشه‌ای این ژنوتیپ ضروری به‌نظر می-رسد. در این راستا، بررسی کارایی استفاده از ترکیباتی جهت افزایش پرآوری درون شیشه‌ای سیب گوشت قرمز، سودمند خواهد بود. نتایج گزارش شده توسط محققان مختلف نشان داده است که استفاده از نانوتیوب‌های کربنی، تأثیر چشمگیری بر افزایش رشد و جوانه‌زنی گونه-های مختلف گیاهی در شرایط درون شیشه‌ای دارند (Patel et al., 2019; Rao and Srivastava, 2014). نانوتیوب‌های کربنی شکل‌های گوناگونی از کربن با ساختار استوانه‌ای هستند که از نظر دمایی و الکتریکی رسانا می‌باشند (Kumar, 2016). نانوتیوب‌های کربنی چند لایه‌ای (MWCNTs[2]) قادرند از دیواره و غشا سلولی عبور کرده و وارد سیتوزول سلول‌های گیاهی شوند. بار سطحی و اندازه

1 - True to type

2 - Multiwalled carbon nanotubes

مختلف MWCNTs باعث تفاوت‌های نسبی در جذب و انتقال نانوتیوب‌ها می‌گردد و اندازه و بار آن‌ها شدیدا بر محل دقیق و توزیع نهایی در بین سلول‌ها و بافت‌های گیاه تأثیر دارد (Zhai et al., 2015). چن و همکاران (۲۰۲۱) دریافتند که کاربرد نانوتیوب کربنی چند دیواره با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در گیاه بادمجان (Solanum nigrum) باعث افزایش طول شاخه و وزن خشک گردید. پیشینه کاربرد نانو مواد صفحه‌ای در علم پزشکی و شرایط درون‌شیشه‌ای باعث ایجاد رویکرد امید بخش برای استفاده از نانو مواد در علم کشاورزی شده است. آزاد شدن کنترل شده ماکرومولکول‌های مختلف در محل هدف در تیمارهای استفاده از نانو مواد، بیانگر پتانسیل این فناوری برای بهبود مقاومت در برابر بیماری‌های مختلف و افزایش رشد گیاه می‌باشد (Neme et al., 2021). صفحات گرافن اکسید، اتم‌های کربن تک لایه‌ای هستند که ساختاری متراکم مانند کندوی عسل با ویژگی‌های منحصر به فرد ایجاد می‌کنند. میزان حلالیت گرافن اکسید در حلال‌های مختلف مخصوصاً آب، در کاربرد مهندسی زیستی بسیار مهم است. حداکثر میزان حلالیت گرافن اکسید در حلال بستگی به قطبیت حلال و میزان فعالیت سطحی در طی اکسیداسیون دارد. مطالعات نشان داده‌اند که مواد گرافن اکسید، مانند فیلم‌های گرافن اکسید، مواد غیر سمی سازگار با محیط زیست هستند که بدون محدودیت، اجازه تکثیر مؤثر را به سلول‌های انسانی و پستانداران می‌دهد (He et al., 2021). به‌منظور درک سازوکار اثر نانو ذرات کربن بر رشد گیاهان تیمار شده و همچنین بررسی محل تجمع آن‌ها در بافت‌های گیاهی از روش‌های مختلفی استفاده شده است که بیشتر جنبه فلورسنس دارند (Ghafariyan et al., 2013). با توجه به مطالب مزبور، پژوهش حاضر به‌منظور بررسی تأثیر نانوتیوب کربن و گرافن اکسید بر پرآوری دو ژنوتیپ سیب (گوشت قرمز و مالینگ مرتون) انجام گردید. همچنین با استفاده از فلورسنس جهت بررسی نفوذ و ردیابی نانوذرات به داخل بافت‌های برگ گیاهان تیمار شده تصویربرداری صورت گرفت.

۲ - روش انجام تحقیق

• محل انجام آزمایش

این آزمایش در آزمایشگاه کشت بافت گیاهی، ارگانوژنز و مورفوژنز گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز و دانشکده کشاورزی دانشگاه مراغه انجام گردید.

• آماده سازی ریزنمونه ها

نمونه‌های گیاهی دو ژنوتیپ سیب گوشت قرمز و مالینگ مرتون ۱۰۶ از مرکز تحقیقات کشاورزی خلعت پوشان دانشگاه تبریز (۳۷ درجه و ۵۹ دقیقه شمالی- ۴۶ درجه و ۲۸ دقیقه شرقی- ۱۷۴۶ متر ارتفاع از سطح دریا) تهیه گردید. نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل شده و پس از ضدعفونی در محیط کشت MS قرار گرفتند. به منظور رفع آلودگی قارچی یا باکتریایی، ریزنمونه شاخساره‌های جمع‌آوری شده به مدت ۱۰ دقیقه با آب جاری شستشو داده شده و پس از ۲۰ دقیقه شستشو با هیپوکلریت سدیم ۲ درصد، ۳ دقیقه شستشو با اتانول ۷۰ درصد زیر هود لامینار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. نمونه‌های ضدعفونی شده در محیط کشت MS داخل شیشه‌های استریل کشت شدند.

شکل ۱- کشت شاخساره‌های سیب در محیط کشت MS

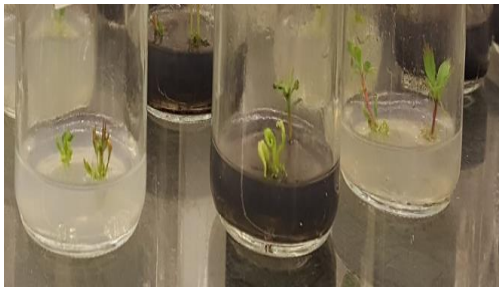
• سنتز نانوذرات

نانوتیوب‌های کربنی ابتدا با استفاده از واکنش اکسایش، تعداد گروه‌های کربوکسیلیک اسید روی نانوتیوب کربنی افزایش پیدا کرده و سپس با استفاده از شیمی آمیدها و معرف‌های کوپلینگ اسید فلوئورسین روی نانوتیوب‌های کربنی قرار گرفت. جهت تایید اتصالات فلوئورسین از تکنیک‌های UV-Vis، FT-IR[3]، طیف سنجی فلوئورسانسی و آنالیز عنصری استفاده شد (Sager et al., 2014). به منظور سنتز گرافن اکسید، گرافن در حضور نیتریک اسید و سولفوریک اسید اکسید شده و با استفاده از امواج التراسونیک لایه‌های گرافنی پخش شده و به‌صورت تک صفحات گرافن اکسید در محلول دیسپرس گردید و با استفاده از فلوئورسین عامل‌دار شدند. همانند عامل‌دار کردن نانوتیوب‌های کربنی، برای تأیید اتصالات و فلوئورسین از تکنیک‌های UV-Vis، FT-IR، طیف سنجی فلوئورسانسی و آنالیز عنصری استفاده شد (Eftekhary et al., 2016).

• کشت نهایی

نمونه‌های مورد استفاده در این آزمایش پس از سه دوره بازکشت به فاصله یک ماه از هر کشت انتخاب شدند. به منظور کشت بافت از محیط کشت MS حاوی هورمون‌های جیبرلین (۱ میلی‌گرم در لیتر) و بنزیل آمینوپورین (۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) استفاده گردید. pH محیط کشت در ۵/۷±۰/۳ تنظیم شد. نانو ذرات به‌منظور اضافه شدن به محیط کشت، ابتدا با غلظت مشخص به آب مقطر اضافه گردید. به منظور دیسپرس شدن کامل ذرات نانو از دستگاه اولتراسونیک به مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد. پس از به‌دست آمدن محلول‌های نانو، به مقدار تعیین شده ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در زیر هود به محیط‌های کشت استریل شده اضافه گردید. نمونه‌های انتخاب شده از دو ژنوتیپ سیب گوشت قرمز و مالینگ مرتون ۱۰۶ در محیط‌های کشت MS حاوی سه غلظت مختلف نانوتیوب¬های کربنی (۰، ۵۰، ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و گرافن اکسید (۰، ۵۰، ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) با سه تکرار و سه ریز نمونه در هر تکرار کشت شد. در مجموع ۱۸ تیمار در قالب طرح کاملا تصادفی مورد بررسی قرار گرفت. غلظت صفر به منزله شاهد میباشد.

3 - Fourier transform infrared spectroscopy



شکل ۲- تیمار گیاهان درون شیشه‌ای با نانوذرات کربنی

• اندازه‌گیری صفات

ریزنمونه‌های کشت شده به مدت یک ماه و هر هفته مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان پرآوری بر اساس اندازه‌گیری طول شاخساره و شمار برگ به ازای هر جداکشت در بازه¬های زمانی ۷ روزه و به مدت ۱ ماه از زمان بازکشت ریزنمونه¬ها محاسبه گردید. طول شاخساره و شمار برگ در هر تکرار در بازه¬های زمانی یاد شده با روش تصویربرداری و آنالیز شکل با بهره¬گیری از نرم افزار Image pro plus بدست آمد. در هر تیمار، پلاستوکرونی به‌عنوان مهمترین شاخص اندام¬زایی اندازه¬گیری شد. پلاستوکرون (فاصله زمانی آغازش دو آغازنده برگی متوالی) در فاصله زمانی دو تاریخ نمونه‌برداری پشت سر هم، جداگانه برای هر تیمار به‌دست آمد. بدین ترتیب ابتدا تفاضل میانگین اندام¬های آغازش یافته در دو تاریخ نمونه¬برداری متوالی به¬دست آمد. از آنجایی‌که فاصله زمانی تاریخ¬های نمونه¬برداری، ۷ روز بود، با انجام تقسیم ۷ روز اختلاف زمانی دو تارخ نمونه¬برداری بر تفاضل میانگین اندام¬های آغازش یافته در آن برهه، پلاستوکرون مربوط به تیمار به¬دست آمد.

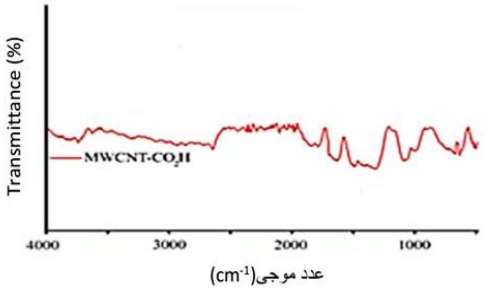
• ردیابی نانوذرات

نخستین مرحله برای بررسی نحوه نفوذ نانوذرات به بافت‌های گیاهی، برداشت نمونه برگی از هر تیمار می‌باشد. همه بررسی‌های انجام شده، بر پایه روش‌های سه بعدی میکروسکوپیک، شامل روش نور بازتابشی و فلورسنس بودند. برگ‌ها پس از برداشت در محلول FAA به مدت ۲۴ ساعت تثبیت شدند. برای تهیه این ماده، ۹ قسمت اتانول ۵۰ درصد با نیم قسمت اسید استیک گلاسیال و نیم قسمت فرمالدهید ترکیب گردید. نمونه¬ها پس از شستشوی با آب معمولی (۱۵ دقیقه)، به شیشه‌های دربسته دارای اتانول ۵۰ درصد، انتقال داده شدند. برای آنکه بتوان نمونه¬های برداشت شده از هر تیمار را در بررسی¬های میکروسکوپیک شناسایی نمود، نمونه‌ها در شیشه¬های کوچک برچسب¬دار که بر روی آن تیمار و تاریخ نمونه¬برداری نوشته شده بود، نگهداری گردیدند. پس از آماده‌سازی نمونه‌ها، جهت شناسایی محل‌های استقرار و نفوذ ذرات کربن به بافت نمونه‌های تیمار شده از میکروسکوپ فلورسنس استفاده شد.

۳- بحث و نتایج

• سنتز نانو مواد عامل‌دار

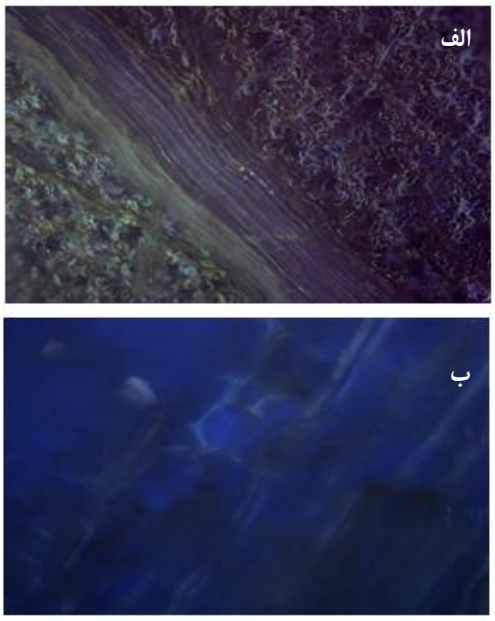
با اکسیداسیون سطح نانو مواد با استفاده از محلول اسید نیتریک، نانو مواد عامل‌دار $CNT\text{-}CO_2H$ تولید می‌گردد. در این مطالعه طیف سنجی IR-FT برای مطالعه حضور گروه‌های فعال در طی تغییرات شیمیایی مواد نانوانجام گرفت. همانطور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، طیف‌هایی در محدوده ۱۰۳۳-۱۰۱۳، ۱۶۴۳-۱۱۵۰ و ۱۷۰۹ و یک پیک بزرگ در ۳۴۶۱-۲۵۷۰ تشکیل شده است که به ترتیب نشان دهنده ارتعاشات کششی پیوندهای C—O، C=C، C=O و O—H است.



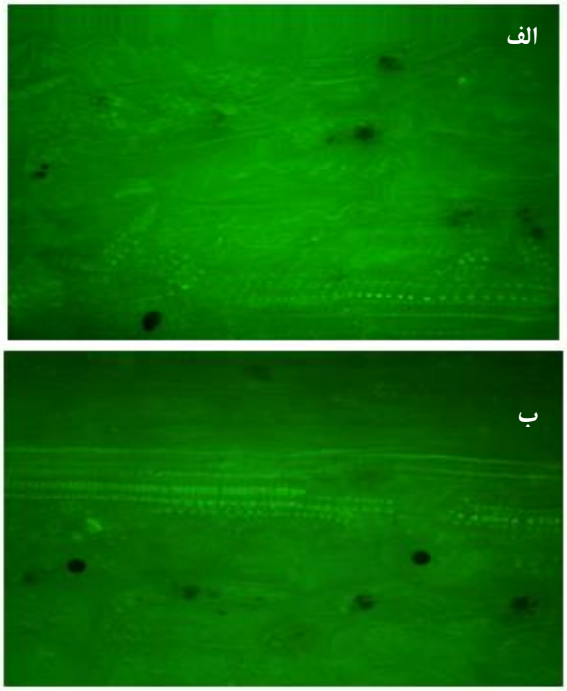
شکل ۳- طیف سنجی FT-IR از نانو تیوب کربن

• شناسایی نانوذرات داخل بافت گیاه

در نمونه‌های گیاهی مورد مطالعه نانوذرات فلورسنس‌دار تیمار شده توسط میکروسکوپ فلورسنس ردیابی گردید. مطابق تصاویر به دست آمده (شکل ۴ و ۵) نانو ذرات به داخل گیاه نفوذ کرده‌اند و بیشتر در بافت‌های آوندی و روزنه‌ها تجمع داشته‌اند. همانطور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود گرافن اکسید از محیط کشت به داخل بافت گیاه نفوذ کرده و در داخل بافت برگ نیز حضور داشته است. در سیب مالینگ مرتون (شکل ۴-الف) ذرات گرافن اکسید به صورت رنگ بنفش در داخل رگبرگ اصلی و بافت¬های اطراف قابل مشاهده است و در سیب گوشت قرمز (شکل ۴-ب) ذرات گرافن اکسید به¬طور کامل داخل سلول¬های بافت برگ جذب و پخش شده است. در شکل ۵ نیز نانوتیوب‌های کربنی که به داخل بافت برگ هر دو گیاه نفوذ کرده‌اند به صورت ذرات سیاه مشاهده می‌گردد. گزارش شده است که نانوذرات مختلف مانند نانوذرات نقره (Kurepa et al., 2010)، نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم و نانوذرات روی (Brayner et al., 2006) تشکیل سوراخ‌های جدید و بزرگ‌تر را در دیواره سلولی و کوتیکول‌ها (Larue et al., 2014) تحریک می‌کنند که منجر به ایجاد تغییرات ساختاری می‌شوند (Wang et al., 2016). نانو ذرات می‌توانند از طریق سیستم آوندی در مریستم نوک ریشه در محلی که حلقه کاسپاری بطور کامل تشکیل نشده یا از مکان‌های تشکیل ریشه جانبی، جایی‌که حلقه کاسپاری شکسته شده است، وارد بافت‌های گیاهی شوند (Wang et al., 2016).



شکل ٤- حضور گرافن اکسید داخل بافت برگ سیب مالینگ مرتون (الف) و سیب گوشت قرمز (ب) به صورت رنگ بنفش



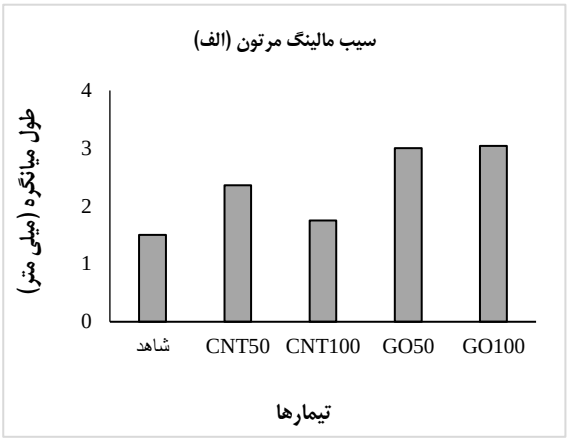
شکل ٥- حضور نانوتیوب کربن داخل بافت برگ سیب مالینگ مرتون (الف) و سیب گوشت قرمز (ب) به صورت نقاط سیاه

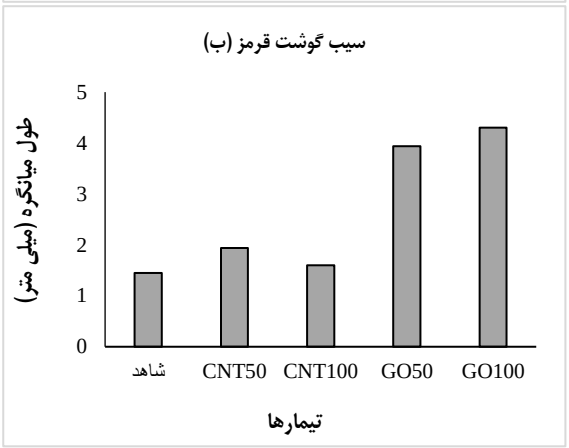
جدول ۱- تأثیر تیمارهای نانوذرات بر تعداد برگ دو ژنوتیپ سیب (در هر صفت و گروه مقایسه شده، تیمارهای با حروف یکسان اختلاف معنی‌داری ندارند.)

تیمارها	ژنوتیپ گوشت قرمز	ژنوتیپ مالینگ مرتون
شاهد	۲۹/۰۸۳ c	۲۸/۳۳۳ b
نانوتیوب کربن (۵۰ میلی‌گرم در لیتر)	۳۰/۱۶۷ c	۱۸/۵۰۰ c
نانوتیوب کربن (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر)	۲۵/۶۶۷ d	۲۷/۱۶۷ b
گرافن اکسید (۵۰ میلی‌گرم در لیتر)	۳۵/۶۶۷ b	۳۵/۷۵۰ a
گرافن اکسید (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر)	۴۱/۹۱۷ a	۳۶/۹۱۷ a

- **تاثیر نانو ذرات بر پرآوری گیاهان درون شیشه‌ای**

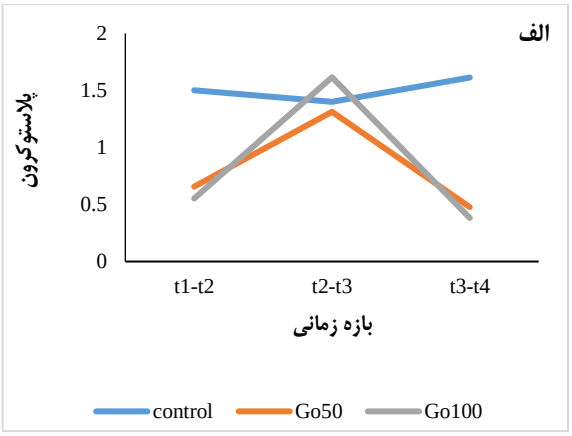
به منظور بررسی تأثیر نانوذرات بر رشد و نمو گیاهان، تعداد برگ ها، پلاستوکرون، طول میانگره در طی یک ماه هر هفته شمارش گردید. نتایج با استفاده از طرح کاملا تصادفی و توسط نرم افزار SPSS تجزیه گردید. همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود در سیب گوشت قرمز تیمار گرافن اکسید بیشترین تأثیر را بر تعداد برگ نسبت به شاهد داشته و تعداد برگ به‌طور قابل توجهی افزایش یافته و این تعداد در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بیشتر است. در سیب مالینگ مرتون نیز گرافن اکسید تأثیر بیشتری نسبت به نانو تیوب کربن بر تعداد برگ نسبت به شاهد داشته است. محققان گزارش کرده‌اند که سرعت بخشیدن به رشد گیاه با استفاده از نانوذرات کربن، برای تنظیم رشد تعدادی از محصولات، مانند گیاهان فضای آزاد، امید تازه ایجاد کرده است (Khodakovskaya et al., 2013). در تحقیق دیگر تعداد و اندازه برگ گیاهان مورد مطالعه، به تیمار نانوذرات کربن به صورت وابسته به غلظت، واکنش مثبتی نشان دادند (Roa and Srivastava, 2014.) اندازه‌گیری طول میانگره شاهد و گیاهان تیمار شده در هر دو گیاه توسط خط‌کش انجام شد. همانطور که در شکل ۶ نشان داده شده است اثر تیمار نانوذرات بر طول میانگره در هر دو گیاه مثبت بوده است ولی این اثر مثبت در مورد نانو ذره گرافن اکسید در مقایسه با نانوتیوب کربن بیشتر بوده است. تأثیر تیمار نانوتیوب کربن با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بر طول میانگره کمتر از سایر تیمارها می باشد. در سایر مطالعات گزارش شده است که گیاهان تیمار شده با ۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نانوتیوب کربنی محلول در آب، افزایش میزان رشد را در تمام قسمت‌های گیاه مثل ریشه‌ها، شاخه‌ها و حتی در شاخه‌زایی نشان داده‌اند. افزایش قابل توجه جذب آب در گیاهان تیمار شده با نانوتیوب کربنی در مقایسه با شاهد، منجر به افزایش رشد گردیده است(Tripathi et al., 2011). در مطالعه‌ای دیگر نانو ذرات کربن رشد گیاه تنباکو را افزایش داده و تقسیم سلولی را با فعال کردن کانال‌های آبی و ژن‌های کنترل کننده تقسیم و توسعه سلولی، تنظیم کرده است (Khodakovskaya et al., 2012). نانوتیوب‌های محلول در آب رشد گیاه نخود را با افزایش توانایی جذب و حفظ آب، افزایش داده‌اند (Tripathi et al., 2011).

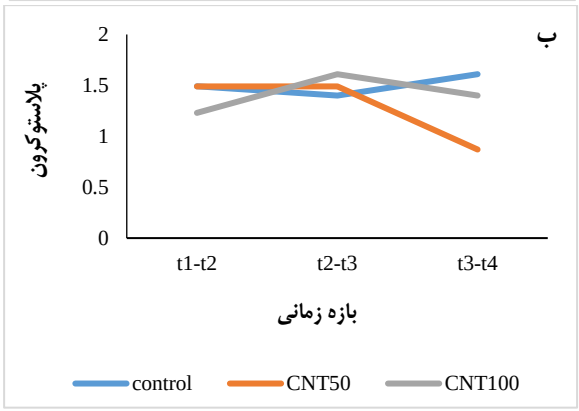




شکل ٦- طول میانگره در سیب مالینگ مرتون (الف) و سیب گوشت قرمز (ب) تحت تأثیر غلظت‌های مختلف گرافن اکسید (GO) و نانوتیوب اکسید (CNT)

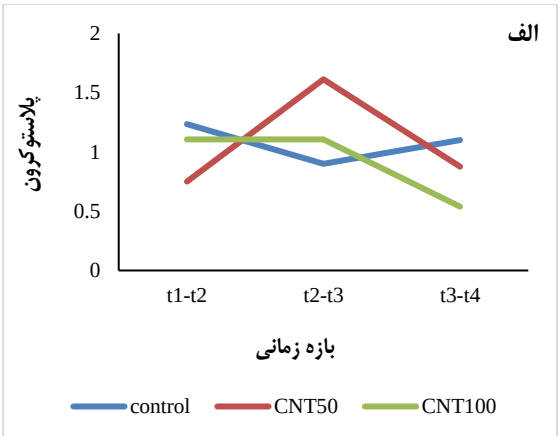
در این تحقیق، تأثیر تیمارها بر میزان پلاستوکرون نیز اندازه‌گیری گردید. نمودار پلاستوکرون بر اساس تعداد برگ تولید شده در بازه‌های زمانی مختلف ترسیم گردید. همانطور که در شکل‌های ۷ و ۸ مشاهده می‌گردد پلاستوکرون در هر دو تیمار گرافن اکسید و نانوتیوب کربن تحت تأثیر قرار گرفته و در واکنش به هر دو تیمار نانوذرات کاهش یافته است. بر اساس نتایج حاصل تأثیر تیمار گرافن اکسید بر سیب گوشت قرمز (شکل ۷-الف) بیشتر از نانو تیوب کربن (شکل ۷-ب) می‌باشد و سرعت رشد در گیاهان تیمار شده با گرافن اکسید بیشتر می‌باشد. در شکل ۸ نیز میزان پلاستوکرون در سیب مالینگ مرتون در بازه‌های زمانی مختلف نشان داده شده است. در این گیاه در بازه زمانی دوم، گیاه شاهد کمترین پلاستوکرون را داشته است ولی در بازه زمانی سوم تأثیر تیمارهای گرافن اکسید (شکل ۸-الف) و نانوتیوب (شکل ۸-ب) قابل مشاهده است که میزان پلاستوکرون در این تیمارها نسبت به شاهد کمتر بوده است. کاهش میزان پلاستوکرون نشان دهنده افزایش سرعت تولید دو آغازنده برگی متوالی است که دلیل بر افزایش سرعت رشد می باشد.

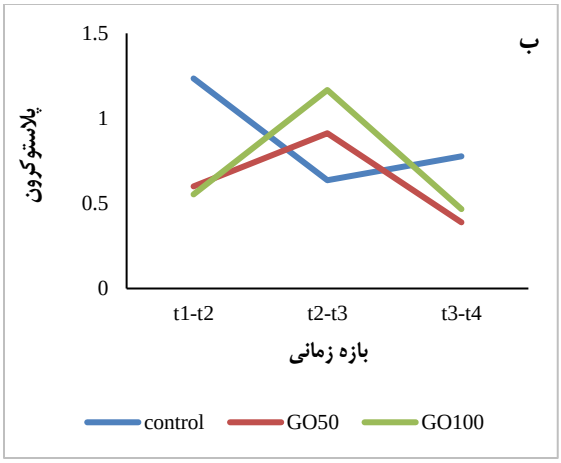




شکل ۷- تأثیر تیمار گرافن اکسید (الف) و نانوتیوب کربن (ب) بر میزان پلاستوکرون در سیب گوشت قرمز (هر بازه زمانی ۷ روز در نظر گرفته شده است)

نانوتیوب‌های کربنی می‌توانند باعث افزایش رشد و فعالیت ژن و بیان پروتئین آکواپورین در سلول‌های تنباکو شوند. به علاوه ژن‌های مرتبط با تقسیم و گسترش سلولی در سلول‌های تیمار شده با نانوتیوب کربنی در مقایسه با سلول‌های شاهد بیشتر بیان شدند (Khodakovskaya et al., 2012). قرار گرفتن سلول‌های گوجه‌فرنگی در معرض نانوتیوب‌های کربن، منجر به فعالیت بسیاری از ژن‌های مربوط به تنش از جمله ژن مسئول پروتئین کانال آبی گوجه فرنگی (LeAqp2) گردیده است. همچنین بیان بیشتر ژن آکواپورین در ریشه‌ها و برگ‌های در معرض نانوتیوب کربن، تأثیر معنی‌داری بر افزایش جوانه‌زنی و رشد دانهال‌های گوجه فرنگی در محیط کشت حاوی نانوتیوب‌های کربن داشته است (Khodakovskaya et al., 2011).





شکل ۸- تأثیر تیمار گرافن اکسید (الف) و نانوتیوب کربن (ب) بر میزان پلاستوکرون سیب مالینگ مرتون

• نتیجه گیری کلی

بر اساس نتایج به دست آمده در این آزمایش نانوذرات کربنی شامل نانوتیوب کربنی چند دیواره و گرافن اکسید به آسانی از محیط کشت سیب مالینگ مرتون ۱۰۶ و سیب گوشت قرمز به بافت گیاه نفوذ کرده و از طریق آوندها به برگ‌ها رسیده‌اند. اثرات مثبت نانو ذرات بر شاخص-های پرآوری اندازه‌گیری شده در این آزمایش شامل تعداد برگ، طول میانگره و پلاستوکرون نیز مشهود است. طبق بسیاری از مطالعات انجام شده در مورد تأثیر نانوذرات بر گیاهان، در پژوهش حاضر نیز نانوذرات با نفوذ به بافت گیاه سیب باعث بهبود رشد گردیده است. در غلظت‌های مورد بررسی از هر دو ترکیب نانوذرات اثرات سمی مشاهده نگردید.

منابع

- Brayner, R., et al. 2006. Toxicological impact studies based on Escherichia coli bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium. Nano Letters, Vol. 6(4), P. 866-870.
- Chen, X., et al. 2021. Small structures with big impact: Multi-walled carbon nanotubes enhanced remediation efficiency in hyperaccumulator Solanum nigrum L. under cadmium and arsenic stress. Chemosphere, Vol. 276, P. 130130.
- Dadpour, M.R., et al. 2011. Determination of floral initiation in Malus domestica: A novel morphogenetic approach. Biologia Plantarum, Vol. 55(2), P. 243-252.
- Dobránszki, J., da Silva, J.A.T. 2010. Micropropagation of apple—a review. Biotechnology Advances, Vol. 28(4), P. 462-488.
- Eftekhari-Sis, B., Mirdoraghi, S. 2016. Graphene oxide-terpyridine conjugate: A Highly selective colorimetric and sensitive fluorescence nano chemosensor for Fe^{2+} in aqueous media. Nanochemistry Research, Vo. 1(2), P. 214-221.
- Geng, F., et al. 2015. In vitro shoot proliferation of apple rootstocks ‘B. 9’, ‘G. 30’, and ‘G. 41’grown under red and blue light. HortScience, Vol. 50(3), P. 430-433.
- Ghafariyan, M.H., et al. 2013. Effects of magnetite nanoparticles on soybean chlorophyll. Environmental science & technology, Vol. 47(18), P. 10645-10652.
- He, Y., et al. (2021). Effect of magnetic graphene oxide on cellular behaviors and osteogenesis under a moderate static magnetic field. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, Vol. 37, P. 102435.
- Khodakovskaya, M.V., et al. 2011. Complex genetic, photothermal, and photoacoustic analysis of nanoparticle-plant interactions. Proceedings of the National Academy of Sciences, Vol. 108(3), P. 1028-1033.
- Khodakovskaya, M.V., et al. 2012. Carbon nanotubes induce growth enhancement of tobacco cells.ACS nano, Vol. 6(3), P. 2128-2135.
- Khodakovskaya, M.V., et al. 2013. Carbon nanotubes as plant growth regulators: effects on tomato growth, reproductive system, and soil microbial community. Small, Vol. 9(1), P. 115-123.
- Kumar, C.P.M.P.S. 2016. A review paper on nano technology. IJIRST, National Conference on Innovations in Micro-electronics, Signal Processing and Communication Technologies, P. 40-42.
- Kurepa, J., et al. 2010. Uptake and distribution of ultrasmall anatase TiO_2 Alizarin red S nanoconjugates in Arabidopsis thaliana. Nano letters, Vol. 10(7), P. 2296-2302.
- Larue, C., et al. 2014. Fate of pristine TiO_2 nanoparticles and aged paint-containing TiO_2 nanoparticles in lettuce crop after foliar exposure. Journal of hazardous materials, Vol. 273, P. 17-26.

- Modgil, M., et al. 2005. Molecular analysis of genetic stability in micropropagated apple rootstock MM106. Scientia Horticulturae, Vol. 104(2), P. 151-160.
- Neme, K., et al. 2021. Application of nanotechnology in agriculture, postharvest loss reduction and food processing: food security implication and challenges, Heliyon, Vol. 7(12), P. e08539
- Patel, A., et al. 2019. Carbon nanotubes as plant growth regulators: impacts on growth, reproductive system, and soil microbial community. In: Nanomaterials in Plants, Algae and Microorganisms. Tripathi, K.D., et al. (eds), Academic Press, P. 23-42.
- Rao, D.P., Srivastava, A. 2014. Enhancement of seed germination and plant growth of wheat, maize, peanut and garlic using multiwalled carbon nanotubes. European Chemical Bulletin, Vol. 3(5), P. 502-504.
- Sager, T.M., et al. 2014. Effect of multi-walled carbon nanotube surface modification on bioactivity in the C57BL/6 mouse model. Nanotoxicology, Vol. 8(3), P. 317-327.
- Shi, X., et al. 2017. Medium pH between 5.5 and 7.5 has Minimal Effects on Tissue Culture of Apple. HortScience, Vol. 52(3), P. 475-478.
- Sun, Q.R., et al. 2014. Optimisation of the media for in vitro shoot proliferation and root induction in three new cold-hardy and dwarfing or semi-dwarfing clonal apple rootstocks. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, Vol. 89(4), P. 381-388.
- Tripathi, S., et al. 2011. Growth stimulation of gram (Cicer arietinum) plant by water soluble carbon nanotubes. Nanoscale, 3(3), P. 1176-1181.
- Wang, P., et al. 2016. Nanotechnology: A New Opportunity in Plant Sciences. Trends in plant science, Vol 21(8), P. 669-712.
- Zhai, G., et al. 2015. Charge, size, and cellular selectivity for multiwall carbon nanotubes by maize and soybean. Environmental science & technology, Vol. 49(12), P. 7380-7390.
- Zhang, S., et al. 2020. A novel NAC transcription factor, $MdNAC_{42}$, regulates anthocyanin accumulation in red-fleshed apple by interacting with MdMYB10. Tree Physiology, Vol. 11;40(3), P. 413-423.

The effect of carbon nanoparticles on physiological characteristics of Red fleshed apples and Malling Merton 106

Maryam Abdolalipour[1*], Mohammad Reza Dadpour[2], Bagher Eftekhari-Sis [3], Ali Reza Motallebi Azar[4]

[*]1- PhD student, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

2- Associate Professor, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

3- Associate Professor, Faculty of chemistry, University of Maragheh, Maragheh, Iran

4- Associate Professor, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

[*]Email Address: Maryam.abdolalipor@gmail.com

Abstract

Micropropagation plays an important role in the production of vigorous and healthy plants in apple tree. Carbon nanoparticles have a significant effect on increasing the growth and germination of different plant species under in vitro condition. In this study, the effect of different kinds of nanoparticles on explant proliferation of two apple genotypes (red fleshed and Malling Merton 106) was investigated. The treatments were multi walled of carbon nanotubes and graphene oxide in 3 concentrations of 0, 50 and 100 mg L^{-1}. In order to investigate the entrance and accumulation of carbon nanoparticles in the plant, a fluorescence microscope with a light spectrum of 530 nm was used. Carbon nanotubes and graphene oxide showed a positive effect on explant proliferation by increasing leaf production and stem length compared to the control. The both treatments improved leaf growth by decreasing plastochron. In this study, the penetration of nanoparticles into leaf tissue was observed. The effect of graphene oxide was most than carbon nanotubes .

Introduction

The increasing of the world population and the reduction of food resources is the important reason to formation and use beneficial methods for plant production. Various methods are used to propagate apples, such as cuttings and bud grafting. These methods do not ensure the production of healthy and disease-free plants, they are seasonal and require a lot of manpower, time and space consuming. Micropropagation is another important method for propagation, especially in plants such as apples, which are difficult to propagate by traditional methods. In the micropropagation process a large number of plants can be obtained in a small space and at a appropriate time. Micropropagation has been used for commercial production of many rootstocks and grafted cultivars of fruit trees such as cherries, grapes and apples (Sun et al., 2014). In apples, the micropropagation of some cultivars is inefficient. However, the use of in vitro methods will be the only option to the production of transgenic plants, preserve the germplasm and secondary metabolites production (Shi et al., 2017).

Red fleshed apple, which is a valuable genotype of the apples with high anthocyanin content, is under danger of extinction. On the other hand, preliminary studies performed on the red fleshed genotype in the tissue culture laboratory of the Horticulture Department of Tabriz University showed that the reproduction of this genotype had a very slow rate under in vitro condition. Considering that the red color of apple flesh is a valuable feature from the perspective of horticulture and consumer market needs (Zhang et al., 2020). Due to the ability of red fleshed apple to production and introduction of a new cultivar, application of the new methods to improve in vitro proliferation of this genotype is necessary. In this regard, innovation and the use of compounds that increase tissue culture efficiency will be very useful.The results of researchers have shown that carbon nanotubes have a significant effect on increasing the growth and germination of in vitro plants (Patel et al., 2019; Rao and Srivastava, 2014). Materials with a particle size of less than 100 nm in at least one dimension are generally classified as Nano (Neme et al., 2021). Multilayer carbon nanotubes (MWCNTs) are able to penetrate to cell walls and membranes and enter the cytosol of plant cells (Zhai et al., 2015).Graphene oxide plates are single-layer carbon atoms. The solubility of graphene oxide in solvents, especially water, is very important in bioengineering applications. The maximum solubility of graphene oxide in a solvent depends on the polarity of the solvent and the amount of surface activity during oxidation. Studies have shown that graphene oxide materials, such as graphene oxide films, are highly environmentally friendly materials that allow human

and mammalian cells to reproduce effectively without toxicity (He et al., 2021). In this study, fluorescence was used to accurately track nanoparticles in leaves to investigate the penetration of nanoparticles into plants tissues. Also, the effect of nanoparticles on the proliferation of treated plants was compared with control plants.

Methodology

Apple plant samples were obtained from Khalatpooshan Agricultural Research Center of Tabriz University. After sterilization, the shoot samples were placed in MS culture medium. In order to eliminate fungal or bacterial contamination, the samples were sterile as follows: 10 minutes dipping in running water, 20 minutes washing with 2% sodium hypochlorite, 3 minutes cleaning with 70% ethanol, washing with sterile distilled water under a laminar hood. The samples were cultured in MS medium containing gibberellin (1 mg L^{-1}) and benzyl aminopurine (1.5 mg L^{-1}). The pH of the culture medium was adjusted to 5.7. Nanoparticles (multi walled of carbon nanotubes and graphene oxide) were first added to distilled water at a certain concentration in order to be added to the culture medium. Ultrasonic device was used for 30 minutes to completely disperse of the nanoparticles. The solutions at the specified amount (0, 50 and 100 mg L^{-1}) were added to the sterilized culture medium under the sterile condition.In order to synthesize of carbon nanotubes, first increased the number of carboxylic acid groups on carbon nanotubes using the oxidation reaction and then were placed on carbon nanotubes using chemical amides and fluorescein acid coupling reagents (Sager et al., 2014).In order to synthesize of graphene oxide, graphene in the presence of nitric acid and sulfuric acid are oxidized by diffusion of graphene layers using ultrasonic waves and singly the graphene oxide plates were dispersed in the solution and activated using fluorescein (Eftekhary et al., 2016). Samples were cultured in the supplemented MS medium containing three different concentrations of carbon nanoparticles (0, 50, 100 mg L^{-1}) with three replications and three samples per each replicate.All cultures were sub-cultured for 1 month and every 7 days. Shoot length, leaf number and amount of Plastochron per replication were assayed in the mentioned time periods. Plastochron is the interval between the emergences of two leaf primers. In order to observe the texture of the samples treated with carbon particles to detect the locations and penetration of these materials, after preparing the samples, a fluorescence microscope was used.

Conclusion

By oxidation of the nanomaterial surface using nitric acid solution, CNT-CO_2H functionalized nanomaterials were produced. IR-FT spectroscopy was performed to study the presence of active groups during chemical changes of nanomaterials. Plants that treated with nanoparticles were studied by fluorescence microscope. According to the obtained results, nanoparticles have penetrated into the plants leave tissues and have accumulated mostly in vascular tissues and stomata. The presence of graphene oxide inside the leaf tissue is clearly seen in red fleshy apples and Malling Merton apples with purple color. Carbon nanotubes that have penetrated into the leave tissue of both plants are seen as black particles. The positive effects of nanoparticles on the proliferation indices were obvious in this experiment including leaf number, internode length and Plastochron.

Keywords

Carbon nanotube, Graphene oxide, Malling Merton, Red fleshed apple