



<https://ijpb.ui.ac.ir/?lang=en>
IRANIAN JOURNAL OF PLANT BIOLOGY

E-ISSN: 2322-2204

Vol. 13, Issue, No. 4, Winter 2021

Document Type: Research Paper

Received: 30/08/2021

Accepted: 28/05/2022

The effect of silver nanoparticles on morphological and physiological properties of *Iris pseudacorus* under *in vitro* conditions

Younes Pourbeyrami Hir^{1*}, Shima Mehri², Esmail Chamani¹, Hassan Maleki Lajayer¹

¹ Faculty of Agricultural Science and Natural Resources, Department of Horticultural Science, University of Mohaghegh Ardabili

² Former M.Sc. student of Horticulture Sciences University of Mohaghegh Ardabili

Abstract

Iris pseudacorus is a perennial herbaceous belonging to the *Iridaceae* family. This family consist of about 300 species of flowering plants with lush flowers. This genus spread widely from the temperate to the coastal areas in the Northern Hemisphere. This study was conducted to investigate the effects of silver nanoparticles on morphological and physiological properties of *Iris pseudacorus* under *in vitro* conditions based on a completely randomized design with 5 replications. In this experiment, different concentrations of silver nanoparticles (0 as a Control, 5, 10, 20, 40, 80 and 160 mg/l) were used as an experimental treatment. The variance analysis showed that the effect of silver nanoparticles on leaf number, seedling length, mean leaf length, regeneration percentage, leaf area, seedling number, chlorophyll a, chlorophyll b, carotenoid, flavonoid and phenol were significant at 1% probability level. The comparison of data means on morphological traits also showed that the highest leaf number, seedling length, leaf mean length, regeneration percentage, leaf area and the number of seedlings were obtained from silver nanoparticles at the rate of 5 mg/L. The results of the data mean comparison on the total phenol and flavonoid of marsh iris showed that the highest amount of total phenol was observed in 10 mg/L of silver nanoparticles and the highest amount of total flavonoid was in silver nanoparticles at the rate of 40 mg/L. On the other hand, the highest amount of chlorophyll a, chlorophyll b, and carotenoids was obtained at 5 mg / l of silver nanoparticles.

Keywords: Flavonoid, *In vitro*, *Iris pseudacorus*, Phenol, Silver nanoparticles

* Corresponding Author: younes_ph62@uma.ac.ir

*Corresponding author
2228- 7744/ © 2021 University of Isfahan



This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>)

DOI: 10.22108/IJPB.2022.130332.1259

اثر نانو ذرات نقره بر ویژگی‌های ریخت‌شناختی و فیزیولوژیک زنبق مردابی (*Iris pseudacorus*) تحت شرایط درون شیشه‌ای

یونس پوری‌رامی هیر^{۱*}، شیما مهری^۲، اسماعیل چمنی^۱، حسن ملکی لجایی^۱

۱. استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

۲. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد علوم باغبانی دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

چکیده

زنبق مردابی گیاهی است چندساله، علفی و متعلق به تیره زنبق که شامل حدود ۳۰۰ گونه از گیاهان گل‌دار است. این جنس به‌طور گسترده‌ای از مناطق معتدل تا مناطق ساحلی در نیمکره شمالی گسترش یافته است. این پژوهش به منظور بررسی تأثیر نانو ذرات نقره بر ویژگی‌های ریخت‌شناختی و فیزیولوژیک زنبق مردابی تحت شرایط درون شیشه‌ای به صورت آزمایشی بر پایه طرح کاملاً تصادفی با ۵ تکرار اجرا شد. در این آزمایش غلظت‌های مختلف نانو ذرات نقره (۰ (شاهد)، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۶۰ میلی گرم بر لیتر) به عنوان تیمار آزمایشی در نظر گرفته شد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تأثیر نانو ذرات نقره بر تعداد برگ، طول گیاهچه، میانگین طول برگ، درصد باززایی، سطح برگ، تعداد گیاهچه، کلروفیل a، کلروفیل b، کارتنوئید، فلاونوئید، فنل در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد. مقایسه میانگین داده‌ها بر صفات ریخت‌شناختی نیز نشان داد که بیشترین میزان تعداد برگ، طول گیاهچه، میانگین طول برگ، درصد باززایی، سطح برگ، تعداد گیاهچه در تیمار نانو ذرات نقره در غلظت ۵ میلی گرم بر لیتر حاصل شد. نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها بر میزان فنل و فلاونوئید کل اندازه‌گیری شده گیاه زنبق مردابی نشان داد، بیشترین میزان فنل در غلظت ۱۰ میلی گرم بر لیتر نانو ذرات نقره و بیشترین میزان فلاونوئید در غلظت ۴۰ میلی گرم بر لیتر نانو ذرات نقره به دست آمد. از طرف دیگر، بیشترین میزان کلروفیل a، کلروفیل b و کارتنوئید در غلظت ۵ میلی گرم بر لیتر حاصل شد.

واژه‌های کلیدی: کشت درون شیشه‌ای، زنبق مردابی، فلاونوئید، فنل، نانو ذرات نقره

* نگارنده مسئول: نشانی پست الکترونیک: younes_ph62@uma.ac.ir، شماره تماس: ۰۹۱۴۱۵۶۸۰۵۳

مقدمه

زنبق مردابی (*Iris pseudacorus*) از خانواده Iridaceae گیاهی چندساله، تالابی و علفی است. گیاهان از یک ریزوم باریک که به قطر ۵-۱ سانتی متر است، رشد می‌کنند. هر گیاه تعداد زیادی برگ دارد که طول آنها بین ۵۰ تا ۱۰۰ سانتی متر و عرض ۳۰-۱۰ سانتی متر است. برگ‌های زنبق مردابی به یک شکل از زمین پدیدار می‌شوند و دارای لبه‌های صاف و عمدتاً پایه هستند (Jacobs et al., 2011). ریزوم، مهم‌ترین عامل گسترش این گیاه است، اما جوانه‌زنی بذری نیز یکی از روش‌های بقای این گیاه محسوب می‌شود، اگرچه تکثیر گیاه از طریق بذر دشوار است (sun et al., 2006). ترکیبات بسیار زیادی در گونه‌های مختلف جنس زنبق وجود دارد که مهمترین آنها ایزوفلاونوئیدها هستند. عصاره استخراج شده از گیاهان تیره زنبق از قبیل زنبق مردابی خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطانی، ضدجهش‌زایی و از همه مهمتر ضدباکتریایی دارد (Crişan and Cantor, 2016). استفاده از گیاه زنبق مردابی به‌عنوان دارو از زمان مصر باستان وجود داشته و از ریزوم آن در درمان آبریزش بینی، گلو درد، سرماخوردگی و دندان درد استفاده شده است و اخیراً نیز مشخص شده است که عصاره این گیاه خاصیت آنتی‌باکتریایی بسیار قوی داشته و در کنترل باکتری‌های گرم مثبت بسیار مؤثر بوده است (Okba et al., 2022). از زنبق مردابی علاوه بر اینکه به‌عنوان گیاه زینتی استفاده می‌شود، به‌علت سیستم ریشه‌ای و قدرت رشد بسیار زیاد آن در شرایط باتلاقی، از آن در کنترل فرسایش خاک و همچنین تصفیه فاضلاب استفاده

شده است (Sutherland, 1990). همچنین، سیستم ریشه‌ای این گیاه قادر است آلودگی‌های نیتراتی را حذف کرده و سبب کنترل گازهای گلخانه‌ای گردد (Sun et al., 2019). کشت بافت درون شیشه‌ای گیاهان زینتی یکی از ابزارهای ورود به بیوتکنولوژی گیاهی است که از ویژگی پرتوانی سلول‌های گیاهی بهره می‌برد (Quiroze et al., 2006). کشت بافت و سلول به میزان زیادی برای تولید زنبق استفاده شده و به مقدار درخور توجهی باعث افزایش تولید و بهبود بخشیدن کیفیت گیاهان تولیدشده از طریق کشت بافت شده است (Da Silva, 2008). در اواسط قرن بیستم، این نظریه که گیاهان از بافت گیاهی قابل تکثیر هستند، به‌طور کامل پذیرفته شد و کاربرد علمی آن در مقیاس تجاری و صنعتی آغاز گردید. در حال حاضر روش‌های کشت بافت گیاهی فقط منحصر به تولید و تکثیر گیاهان نبوده، درحالی‌که شامل برخی از موارد همچون تولید گیاهان عاری از ویروس و بیماری، جنین‌زایی رویشی، امتزاج پروتوپلاست، تولید متابولیت ثانویه و... است (Alizadeh, 2011). نانوبیوتکنولوژی یک زمینه جدید از علم مدرن است و کاربرد نانوذرات فلزی، به‌ویژه نقره، طلا و پلاتین، به‌سرعت در حال ظهور است. نانو ذرات مجموعه‌های اتمی یا مولکولی با کمینه ابعاد بین ۱-۱۰۰ نانومتر هستند که خواص فیزیکی و شیمیایی متفاوتی در مقابله با توده مواد خود دارند (Monica et al., 2009). نانو ذرات نقره (Silver nanoparticles) به‌علت داشتن سطح ویژه بسیار بالا و واکنش‌پذیری بالای اتم‌های سطحی نسبت به یون نقره دارای خواص ضد میکروبی خیلی بالایی بوده و

عملکرد مشاهده شده است (Lin and Xing, 2007; Lee et al., 2008; El-Temsah and Joner, 2012). طی مطالعاتی روی گیاه کاکتوس (*Caralluma tuberculata*) نشان داده شد که غلظت‌های مختلف نانو ذرات نقره به‌طور درخور توجهی بر تکثیر کالوس تأثیر می‌گذارد و در صورت ترکیب با هورمون‌های رشد در محیط MS شاخص زیست‌توده کالوس را به‌طور قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌دهد. بیشترین تجمع کالوس، زیست‌توده‌ای با وزن تر (۰/۷۸ گرم بر لیتر) و وزن خشک (۱/۰۵۱ گرم بر لیتر) در کشت درون شیشه‌ای با ترکیب مشترکی از ۶۰ میکروگرم بر لیتر نانو ذرات نقره و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر ۴،۲-دی کلروفنو کسی استیک اسید به‌علاوه ۳ میلی گرم بر لیتر هورمون بنزیل آدنین، مشاهده شده است (Ali et al., 2019). در مطالعه‌ای از ریزنمونه‌های برگ انگور رقم‌های Rashe، Khoshnave و Farkhi استفاده شد. از نانو ذرات نقره برای گندزدایی سطحی ریزنمونه‌ها در فرآیند کشت بافت نیز استفاده شده و مشاهده شده است که در تیمارهای نانو نقره تعداد کمی از ریزنمونه‌های سوخته وجود دارد و با افزایش غلظت نانو ذرات نقره و زمان ضدعفونی بهترین نتیجه به دست آمده است (Gouran et al., 2014).

همچنین در پژوهشی دیگر دریافتند که حضور اتیلن در گیاه *Tecomella undulata* در طول ریزازدیادی باعث ریختن برگ‌ها، کاهش در کلروفیل کل و سرانجام نابودی نمونه می‌شود. در صورتی که حضور نانو ذرات نقره در محیط کشت MS درصد زنده ماندنی نمونه را بهبود بخشیده و

بر همین اساس در سالیان اخیر به موازات رشد و توسعه علم نانو تکنولوژی، کاربرد نانو ذرات نقره در محصولات بهداشتی و در مبارزه بر علیه عوامل بیماری‌زا هم گسترش یافته است (Zhang et al., 2005; Kim et al., 2007; Kim et al., 2008). در پژوهشی روی ریزنمونه‌های زیتون مشخص شده است که نانو ذرات نقره با غلظت‌های کم (۴ میلی گرم بر لیتر) به خوبی توانسته‌اند آلودگی‌های قارچ و باکتری را بدون آسیب رساندن به ریزنمونه‌ها کنترل نمایند (Gosh et al., 2010). نانو ذرات نقره به‌علت تأثیر بر ویژگی‌های فیزیولوژیک و عملکرد ضد میکروبی شناخته شده ممکن است در فرآیندهای ضد عفونی سطحی ریزنمونه‌ها برای کشت‌های درون شیشه‌ای استفاده بالقوه داشته باشند (Sarmast and Salehi, 2016). همچنین، نشان داد شده است که نانو ذرات نقره در کاهش آلودگی باکتریایی در گیاه ارکیده (*Vanilla planifolia*) مؤثر هستند (Spinoso et al., 2017). اثر ذرات نانو نقره بر تحمل به شوری گیاه زیره سبز (*Cuminum Cyminum*) در مراحل جوانه‌زنی در شرایط آزمایشگاهی نیز بررسی شده است و نتایج نشان داده است که تیمار ۲۰ میلی گرم بر لیتر ذرات نانو نقره در سطوح مختلف شوری بر شاخص‌های درصد جوانه‌زنی و قوه نامیه بذرها اثر معنی‌داری داشته و سبب افزایش مقاومت به شوری گیاه زیره سبز شده است (Ekhtiyari and Moraghebi, 2012). بر اساس گزارشات متعدد دیگر در غلظت‌های بالاتر، نانو ذرات نقره اثرات منفی از جمله تأخیر در جوانه‌زنی بذر، رشد شاخساره و ریشه، تأخیر در گلدهی و کاهش

باعث افزایش میانگین تعداد ساقه و طول نمونه شده است (Sarmast et al., 2015). در مطالعه‌ای دیگر تأثیر نانو ذرات نقره در اندازه‌های بین ۵۳/۹۴ و ۲۸۸/۵ نانومتر و در غلظت‌های ۰، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۰۰ پی‌پی‌ام بر تغییرات شاخص‌های فیزیولوژیک مانند آنتوسیانین کل، الگوی پروتئین محلول کل و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز گیاهچه‌های گوجه در محیط کشت درون شیشه‌ای بررسی شد. نتایج نشان داد که میزان آنتوسیانین در پاسخ به حضور نانو ذرات نقره کاهش معنی‌داری را تا غلظت ۱۰ پی‌پی‌ام به دنبال داشته است. پروتئین محلول کل گیاه با افزایش غلظت نانو ذرات نقره در اندام هوایی افزایش و در ریشه با افزایش غلظت در ۲۰ و ۴۰ پی‌پی‌ام نسبت به شاهد کاهش نشان داد. همچنین شدت بیان شش باند پروتئینی تحت تیمار با نانو ذرات نقره تغییر نمود. با افزایش غلظت نانو ذرات در محیط کشت افزایش در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در ریشه‌ها و اندام هوایی مشاهده گردید و به‌طور کلی نانو ذرات نقره موجب افزایش در میزان متابولیت‌های ثانویه در گیاهان شدند (Razavizadeh., 2019). تا آنجا که مطالعات بررسی شده‌اند، هیچگونه گزارشی در زمینه اثر نانو نقره بر کشت درون شیشه‌ای زنبق مردابی منتشر نشده است. با توجه به اهمیت گیاه زینتی-دارویی زنبق مردابی و قابلیت رشد آن در مناطق باتلاقی و همچنین ویژگی‌های این گیاه در تصفیه فاضلاب و بهبود آلودگی‌های زیست-محیطی از جمله آلودگی‌های نیراتی اهداف تحقیقی بسیار زیادی می‌توان برای این گیاه در نظر گرفت. از جمله اینکه

این گیاه در تالاب‌ها زندگی می‌کند و تکثیر آن از طریق ریزوم راحت‌تر بوده ولی با بذر مشکل است و از طرف دیگر به علت تغییرات اقلیمی و خشک شدن تالاب‌ها، زیستگاه‌های این گیاه در حال انقراض به تدریج در حال از بین رفتن است و برای جلوگیری از انقراض آنها می‌توان از تکثیر در شرایط درون شیشه‌ای استفاده کرد. با این حال، این مطالعه سعی شده است اثر نانو نقره بر میزان باززایی و تولید برخی از متابولیت‌های ثانویه در شرایط کشت درون شیشه‌ای بررسی گردد. اطلاعات این پژوهش می‌تواند زمینه تحقیقات گسترده‌تر آینده را در زمینه به کارگیری نانو نقره به عنوان یک ماده با اثر احتمالی در ممانعت از فعالیت اتیلن و نیز افزایش تولید ترکیبات این گیاه تحت شرایط درون شیشه‌ای فراهم آورد. استفاده از تکثیر درون شیشه‌ای نیز می‌تواند جایگزین مناسبی برای غلبه بر مشکلات تکثیر در این گیاه باشد. بنابراین، با توجه به کاربردهای پر اهمیت نانو ذرات نقره در زمینه کشاورزی و نیز مصارف دارویی و زینتی این گیاه از زمان مصر باستان، به نظر می‌رسد که تولید درون شیشه‌ای ریزوم این گیاه در سطح وسیع و استفاده از موادی برای افزایش میزان تولید متابولیت‌های ثانویه در آنها می‌تواند سبب بالا رفتن ارزش این گیاه دارویی-زینتی گردد. بنابراین، هدف کلی از این پژوهش مطالعه تأثیر این ماده بر میزان باززایی درون شیشه‌ای زنبق مردابی و ارزیابی غلظت‌های مختلف نانو ذرات نقره روی برخی از متابولیت‌های ثانویه گیاه زنبق مردابی و همچنین، به دست آوردن ارتباط بین نانو ذرات نقره و مشخص

کردن میزان واکنش ویژگی‌های ریخت‌شناختی و فیزیولوژیک گیاه زنبق مردابی به این ماده است.

مواد و روش

به منظور تأمین منبع گیاهی، بذر گیاه زنبق مردابی از شرکت بانک بذر جنوب واقع در شیراز خریداری شد. بذر این گیاه دارای خواب فیزیولوژیک بوده و جنین این بذرها پتانسیل رشد کمی دارند و درصد جوانه‌زنی آنها کم است. برای رفع این مشکل بذرها به مدت ۲۴ ساعت در محلول ۲۰ مولار NaOH قرار گرفتند و هر یک ساعت تکان داد شدند، پس از آن بذرها به مدت ۱۰ دقیقه در مقابل جریان آب قرار گرفتند تا پوسته خارجی آنها سست شده و جدا شود. بذرها با استفاده از اتانول ۷۰٪ به مدت ۱ دقیقه و هیپوکلرید سدیم ۳٪ به مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی شده و ۳ بار (۱۰، ۱۵ و ۲۰ دقیقه) با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. سپس بذرها تحت شرایط استریل در محیط کشت حاوی $MS \frac{1}{2}$ کشت شدند. دو ماه پس از جوانه‌زنی بذرها، برگ‌ها و ریشه‌ها از دانهال‌ها حذف شده و هیپوکتیل در محیط کشت MS با ۳۰ میلی گرم بر لیتر ساکارز و ۷ میلی گرم بر لیتر آگار، بدون تیمار اصلی که آن را به عنوان شاهد در نظر گرفته و غلظت‌های متفاوتی از تیمار نانو ذرات نقره با غلظت‌های صفر (شاهد)، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ میلی گرم بر لیتر در ۵ تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی کشت شدند. سپس نمونه‌ها به اتاقک رشد با دمای 24 ± 2 درجه سانتیگراد منتقل گردیدند. دو ماه پس از قرار گرفتن نمونه‌ها در تیمار نانو ذرات نقره برای اندازه‌گیری صفات گیاهی از آنها استفاده شد.

برای اندازه‌گیری طول برگ و طول ریشه از خط کش استفاده شد. تعداد ریشه، تعداد برگ، تعداد گیاهچه و درصد باززایی به صورت چشمی شمارش شد. وزن تر گیاهچه‌ها با ترازوی یک هزارم اندازه‌گیری گردید. اندازه‌گیری سطح برگ با استفاده از نرم افزار Imagej.exe انجام گرفت. برای سنجش میزان کلروفیل a/b گرم از نمونه گیاهی وزن شد. سپس نمونه گیاهی درون هاون چینی قرار داده شده در داخل ظرف حاوی یخ، سائیده شد و یک میلی لیتر استون ۸۰٪ به محتوای هاون چینی افزوده شد. پس از ساییدن نمونه گیاهی و تهیه محلول یکنواخت، محتویات هاون به مدت ۱۰ دقیقه و با سرعت ۶۰۰۰ آر پی ام سانتریفیوژ گردید. سپس محلول رویی را برداشته و در طول موج‌های ۶۴۵، ۶۶۳ و ۴۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر مدل Jenway و ساخت کشور آمریکا قرائت گردید (Arnon, 1994). برای اندازه‌گیری مقدار فنل، یک گرم از نمونه گیاهی مورد نظر وزن گردیده و در داخل هاون چینی قرار داده شده و با یخ ساییده گردید. سپس ۱۰ میلی لیتر از متانول ۸۰٪ به آن اضافه شد. اندازه‌گیری محتوای فنل کل موجود در عصاره گیاه طبق روش Slinkard and Singleton (۱۹۷۷)، با کمی تغییر و با استفاده از معرف فولین سیوکالتیو اندازه‌گیری شد. ۰/۱ میلی لیتر از عصاره گیاهی سانتریفیوژ شده را درون میکروتیوپ ریخته و سپس ۱/۵ میلی لیتر فولین سیوکالتیو ده برابر رقیق شده به عصاره فوق اضافه شد. پس از گذشت ۵ دقیقه در دمای اتاق ۱/۴ میلی لیتر کربنات سدیم ۷٪ به آن اضافه گردید. محلول حاصل پس از هم‌زدن به مدت ۳۰ دقیقه در

نتایج

صفات ریخت‌شناختی

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر تیمارهای نانو ذرات نقره به کار رفته بر برخی صفات ریخت‌شناختی اندازه‌گیری شده در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شد و همچنین این تیمارهای نانو ذرات نقره بر تعداد ریشه و طول ریشه تأثیری نداشته است (جدول ۱). با توجه به مقایسه میانگین داده‌ها نتایج نشان داد که با افزایش غلظت نانو ذرات نقره صفات ریخت‌شناختی شامل: تعداد برگ، طول گیاهچه، میانگین طول برگ، سطح برگ، تعداد گیاهچه و وزن تر گیاه زنبق مردابی روند نزولی داشته است (شکل ۱)، به‌طوری‌که بیشترین میزان در غلظت ۵ میلی گرم بر لیتر نانو ذرات نانو نقره و کمترین در غلظت ۴۰ میلی گرم بر لیتر حاصل شد (جدول ۳).

صفات فیزیولوژیک

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر تیمارهای نانو ذرات نقره به کار رفته بر تمامی صفات فیزیولوژیک اندازه‌گیری شده در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شد (جدول ۲). با توجه به مقایسه میانگین داده‌ها، نتایج نشان داد بیشترین میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کارتنوئید و فنل کل در غلظت ۵ میلی گرم بر لیتر و کمترین در ۴۰ میلی گرم بر لیتر حاصل شد. بیشترین میزان فلاونوئید در غلظت ۴۰ میلی گرم بر لیتر نانو ذرات نقره و کمترین در غلظت ۵ میلی گرم بر لیتر و شاهد به دست آمد (جدول ۳).

تاریکی نگهداری شد. سپس میزان جذب رنگ در طول موج ۷۶۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر مدل Jenway قرائت شد. نمونه بلانک با جایگزین کردن ۰/۷ میلی لیتر آب مقطر به جای عصاره گیاهی تهیه گردید (Slinkard and Singleton., 1977). به منظور اندازه‌گیری فلاونوئید طبق روش Woisky و Salatino (۱۹۹۸)، ۰/۲ گرم از نمونه گیاهی منجمد شده وزن شد و درون هاون چینی قرار داده شد. سپس ۱ میلی لیتر اتانول اسیدی (اتانول و اسید استیک به نسبت ۹۹ به ۱) به محتویات هاون چینی اضافه شد. پس از ساییدن نمونه گیاهی و تهیه محلول یکنواخت و پس از گذشت ۲۴ ساعت محلول مورد نظر به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور ســـــانتریفیوژ (مدل 15_KSIGMA 1 و ساخت کشور آلمان) شد، میزان فلاونوئید کل به روش رنگ سنجی آلومینیوم کلرید اندازه‌گیری شد. در این روش میزان ۰/۵ میلی لیتر از محلول عصاره با ۱/۵ میلی لیتر اتانول ۰/۹۵٪، ۰/۱ میلی لیتر آلومینیوم کلرید ۱۰٪، ۰/۱ میلی لیتر استات پتاسیم یک مولار و ۲/۸ میلی لیتر آب مقطر مخلوط گردید. پس از نگهداری نمونه‌ها در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه، جذب مخلوط توسط اسپکتوفتومتر (مدل Jenway) در طول ۴۱۵ نانومتر قرائت شد (Woisky and Salatino., 1998).

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه 9.1 و رسم نمودارها توسط نرم افزار Excel انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن صورت گرفت.

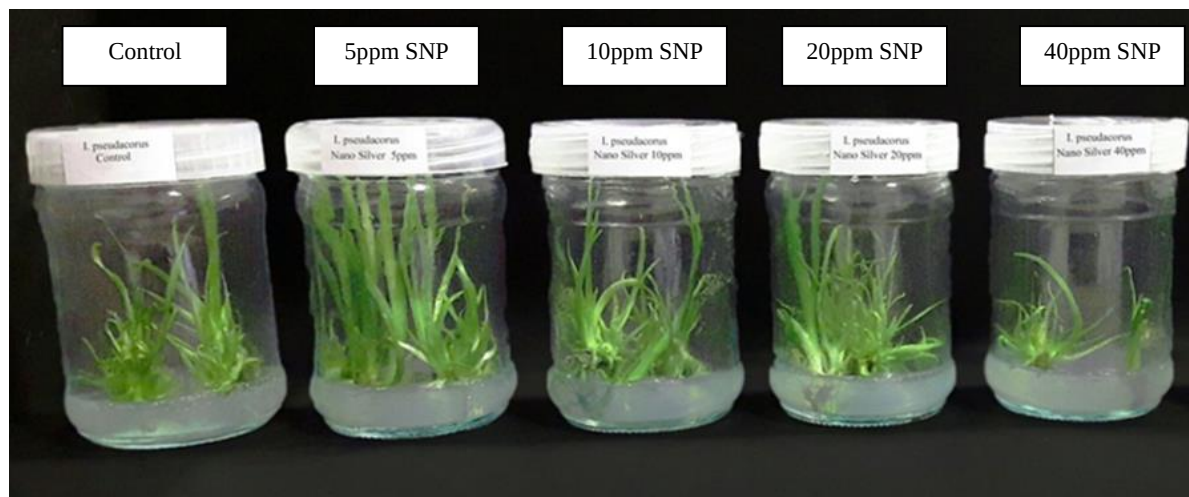
جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر نانو ذرات نقره در غلظت های مختلف بر صفات ریخت شناختی زنبق مردابی

Table 1- Analysis of variance of the effect of silver nanoparticles at different concentrations on Morphological *Iris pseudacorus*

میانگین مربعات MS										
منابع تغییرات	درجه آزادی	تعداد برگ	تعداد ریشه	طول گیاهچه (سانتی متر)	طول ریشه (سانتی متر)	میانگین طول برگ (سانتی متر)	درصد باززایی	تعداد گیاهچه	وزن تر گیاهچه (گرم)	سطح برگ
غلظت نانو ذرات نقره	۴	۵۴/۷۵ ^{**}	۰	۴/۶۳ ^{**}	۰	۴/۸۷۸ ^{**}	۱۶۰/۷۱۴ ^{**}	۱۰/۴ ^{**}	۰/۰۴ ^{**}	۸/۵ ^{**}
خطای آزمایشی	۲۰	۰/۵۳	۰	۰/۱۱	۰	۰/۱۰۵	۷۱/۴۲۹	۴/۹۵ ^{**}	۰/۰۵	۶/۹
ضریب تغییرات %	–	۵/۰۴	۰	۵/۸۹	۰	۹/۶۴	۸/۶۳	۳/۹	۱/۰۲	۱۲/۸۶

*, **, ns به ترتیب نشان دهنده معنی دار بودن در سطح ۵٪، ۱٪ و عدم معنی داری است.

*, **, and ns, significant at the 5% and 1% and not significant probability levels, respectively.



شکل ۱- تأثیر غلظت های مختلف نانو ذرات نقره (SNPs) بر رشد گیاهچه های زنبق مردابی (*Iris pseudacorus*).

Figure 1- The effect of different concentrations of silver nanoparticles (SNPs) on the growth of *Iris pseudacorus* seedlings.

جدول ۲- تجزیه واریانس تأثیر نانو ذرات نقره در غلظت های مختلف بر روی صفات فیزیولوژیک زنبق مردابی.

Table 2- Analysis of variance of the effect of silver nanoparticles at different concentrations on physiological traits of *Iris pseudacorus*.

میانگین مربعات MS						
منابع تغییرات	درجه آزادی	کلروفیل a	کلروفیل b	کارتونوئید	فنل	فلاونوئید
غلظت نانو ذرات نقره	۶	۰/۰۷**	۰/۰۴**	۵۱۴/۴**	۶/۸۶**	۴/۳۷۵ **
خطای آزمایشی	۲۴	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۲/۲	۱/۶۷۸	۱/۰۰۷
ضریب تغییرات %	–	۲/۱۱	۲/۱۱	۲	۹/۱۹	۱۱/۷۸

*, **, ns به ترتیب نشان دهنده معنی دار بودن در سطح ۵٪، ۱٪ و عدم معنی داری است.

*, **, and ns, significant at the 5% and 1% and not significant probability levels, respectively.

جدول ۳- مقایسه میانگین تأثیر نانو ذرات نقره در غلظت‌های مختلف بر صفات ریخت‌شناختی و فیزیولوژیک زنبق مردابی.

Table 3- Comparison of the average effect of silver nanoparticles at different concentrations on morphological and physiological traits of *Iris pseudacorus*

SNPs(M)	تعداد برگ	طول گیاهچه (سانتی‌متر)	درصد باززایی	تعداد گیاهچه	وزن گیاهچه	وزن تر گیاهچه (گرم)	سطح برگ	کلروفیل a (میلی گرم بر وزن تر)	کلروفیل b (میلی گرم بر وزن تر)	کارتونید (میلی گرم بر وزن تر)	فنل (میلی گرم بر وزن تر)	فلاونوئید (میلی گرم بر وزن تر)
0	0.325 ^d	1.235 ^c	0.864 ^b	0.651 ^c	0.864 ^b	1 ^b	5.1 ^c	6.2 ^b	100 ^a	6.2 ^b	5.1 ^b	15.56 ^b
5	0.325 ^d	1.845 ^a	0.954 ^a	0.754 ^a	0.954 ^a	1.05 ^a	6.23 ^a	7.2 ^a	100 ^a	7.2 ^a	6.9 ^a	17.7 ^a
10	0.465 ^c	1.452 ^b	0.745 ^c	0.715 ^b	0.745 ^c	0.95 ^c	5.59 ^b	5 ^d	100 ^a	5 ^d	4.2 ^c	15.12 ^b
20	0.499 ^b	0.985 ^d	0.678 ^d	0.594 ^c	0.678 ^d	0.9 ^d	4.95 ^d	5.35 ^c	100 ^a	4.7 ^c	4.5 ^d	15.4 ^b
40	0.512 ^a	0.845 ^e	0.124 ^e	0.114 ^d	0.124 ^e	0.6 ^e	2.78 ^e	3.4 ^e	95 ^b	3 ^e	2.3 ^e	8.8 ^c

حروف مشترک در هر ستون بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.

Common letters in each column indicate no significant difference at 5% probability level.

بحث

در پژوهشی Hosseinzadeh و همکاران

(۲۰۱۴) گل‌های بریده رز رقم *Full house* را با

غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ پی‌پی‌ام نانو ذرات نقره به مدت یک ساعت به صورت پالسی تیمار دادند.

طبق نتیجه حاصل، تیمار نانو ذرات نقره با غلظت ۵۰ پی‌پی‌ام اثرات مطلوبی بر صفت وزن تر داشته است

و در غلظت ۱۰۰ پی‌پی‌ام اثرات نامطلوبی بر وزن تر داشت و وزن تر به طور درخور توجهی کاهش یافته

است. این نتایج با یافته‌های پژوهش حاضر مطابقت دارد. طی گزارشات Ehsanpour و Jones (۲۰۰۱)

نتایج به دست آمده بر گیاه چچم (*Lolium multiflorum*) نشان داد که نانو ذرات نقره علاوه

بر کاهش رشد ریشه باعث تغییراتی در ویژگی‌های ریخت‌شناختی آن شده و در غلظت‌های خاصی از

نانو نقره سلول‌های پوششی ریشه به شدت تخریب شده و از بین رفته‌اند. در پژوهشی رشد صعودی

ریشه در شلغم هندی (*Brassica Juncea*) در شرایط آزمایشگاهی با به کار بردن تیمارهای ۰ تا

۴۰۰ میلی گرم بر لیتر نانو نقره گزارش شده است

(Sharma et al., 2012). همچنین، در پژوهشی

دیگر رشد نزولی ریشه در ۶۰ میکروگرم بر میلی لیتر

نانو نقره در برنج گزارش شده است. این نتایج

متفاوت نشان‌دهنده اثرات متفاوت نانو ذرات نقره

روی میزان وزن ریشه گونه‌های مختلف گیاهی

است (Mirzajani et al., 2013). این نتایج با

یافته‌های پژوهش حاضر مطابقت دارد. Karami

Mehrian و همکاران (۲۰۱۳) تحقیقی به منظور

بررسی اثرات نانو ذرات نقره روی ویژگی‌های

ریخت‌شناختی گیاه گوجه‌فرنگی انجام دادند و

مشاهده کردند که با افزایش غلظت نانو ذرات نقره

تعداد برگ‌ها در مقایسه با گروه شاهد به طور

معنی‌داری کاهش یافت، این کاهش را می‌توان

ناشی از اثرات سمیت نانو ذرات نقره به علت اندازه

بسیار کوچک، قدرت نفوذ بالا و همچنین،

فراهم‌آوری سطح عملکرد بسیار بالایشان در گیاه

گوجه‌فرنگی دانست که این نتایج با یافته‌های

پژوهش حاضر مطابقت دارد.

Ghanati و همکاران (۲۰۱۴) نیز پژوهشی را برای بررسی اثر نانو ذرات نقره بر متابولیت ثانویه گیاه بومادران انجام دادند که نتایج نشان داد افزایش غلظت نانو ذرات نقره به‌عنوان محرک باعث افزایش تولید فلاونوئیدها و کاهش آنتوسیانین‌ها می‌شود. در این بررسی مشاهده شد که غلظت‌های بالای نانو ذرات نقره سبب تولید یک سری متابولیت‌های ثانویه جدید و ناشناس و نیز کاهش متابولیت‌های شناخته‌شده در این گیاه شد. در تحقیقی دیگر که به‌منظور بررسی تأثیر نانو ذرات نقره بر میزان تولید متابولیت ثانویه گیاه آلوئه‌ورا در شرایط کشت سلولی انجام گرفت مشاهده شد که با افزایش غلظت نانو ذرات نقره و مدت زمان مواجهه با این ترکیب زیست‌توده و تولید متابولیت ثانویه آلوئین در این گیاه کاهش می‌یابد. احتمالاً این اتفاق به این علت باشد که نانو ذرات نقره می‌توانند بر فعالیت آنزیم‌های دخیل در رشد سلول اثر بگذارند (Raei et al., 2014). مشخص شده است که نانو نقره می‌تواند به دیواره سلولی نفوذ کرده و تغییر در نفوذپذیری دیواره ایجاد کند و با تغییر در جذب و دفع مواد توسط دیواره بر بسیاری از فرآیندهای داخل سلول تأثیر گذار باشد. نانو نقره می‌تواند به فسفر و سولفور موجود در دیواره متصل شود و به‌این‌صورت به DNA متصل شده و حتی در ساختار و عملکرد پروتئین‌ها و آنزیم‌ها نیز تغییر ایجاد کند. باتوجه‌به اتصال نانو نقره با DNA می‌توان کاهش تولید متابولیت‌های ثانویه (تاکسول به‌عنوان مهمترین متابولیت ثانویه در گیاه سرخدار) را به کاهش رونویسی ژن‌های دخیل در این فرآیند نسبت داد (Asghari et al., 2009). نتایج این

تحقیقات با نتایج پژوهش حاضر که مشاهده شد با افزایش غلظت نانو نقره میزان تولید ترکیبات فنل و فلاونوئیدی در گیاه زنبق مردابی کاهش می‌یابد، مطابقت دارد.

Alimoradi و همکاران (۲۰۱۳) در بررسی میزان کلروفیل و کاروتنوئید گیاه آلسترومریا (*Alstroemeria aurantiaca* cv. 'Tampa') در شرایط آزمایشگاهی مشاهده کردند که میزان کلروفیل a در تیمارهای نانو نقره و شاهد تفاوت معنی‌داری نداشتند. میزان کلروفیل b تیمارهای ۱، ۰ و ۱/۵ پی‌پی‌ام نانو نقره نیز نسبت به یکدیگر و تیمارهای ۰/۵ و ۲ پی‌پی‌ام تفاوت معنی‌داری نشان ندادند. میزان کلروفیل b در تیمار ۲ میلی‌گرم بر لیتر نسبت به تیمار ۰/۵ پی‌پی‌ام افزایش نشان داد. در بررسی میزان کلروفیل کل تیمارهای مختلف نانو ذرات نقره تفاوت معنی‌داری نسبت به شاهد نداشتند. مشتقات کلروفیلی گیاهان در مجموعه زیادی از فعالیت‌های زیستی دخیل هستند و به‌علت داشتن خواص و عملکرد پاد اکسایشی و ضد میکروبی شناخته شده هستند (Ghanati and Bakhtiarian., 2014). نتایج به دست آمده Dorna و همکاران (۲۰۱۰) از سنجش رنگی‌های فتوسنتزی نشان می‌دهد که میزان این رنگی‌ها در اثر تیمار با نانو ذرات نقره در مقایسه با شاهد افزایش یافته است. افزایش محتوای کلروفیل در غلظت‌های پایین تیمار با نانو ذرات نقره می‌تواند به‌علت اثر بازدارندگی آن بر اتیلن باشد. اتیلن موجب انتقال اکسین و کاهش میزان کلروفیل می‌شود. همچنین، نقره از طریق اتصال به رستورهای اتیلن و در نتیجه کاهش تولید اتیلن با

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج به دست آمده می‌توان اظهار داشت که کاربرد غلظت کمتر نانو ذرات نقره برای افزایش صفات ریخت‌شناختی به جز تعداد ریشه و طول ریشه گیاه زنبق مردابی مناسب است و تأثیر مطلوب‌تری در باززایی زنبق دارد. همچنین در ارتباط با صفات فیزیولوژیک شامل: فنل کل، کلروفیل a، کلروفیل b و کارتنوئید بیشترین میزان در غلظت ۵ میلی گرم بر لیتر و کمترین در ۴۰ میلی گرم بر لیتر حاصل شد. ولی بیشترین میزان فلاونوئید در غلظت ۴۰ میلی گرم بر لیتر نانو ذرات نقره و کمترین در غلظت ۵ میلی گرم بر لیتر و شاهد به دست آمد.

تحریک بیوستنز پلی آمین‌ها باعث مداخله در عملکرد اتیلن می‌گردد. در تحقیقاتی دیگر، Abou-zeid و Mostafa (۲۰۱۴) بیان کرده‌اند که نانو ذرات نقره باعث افزایش محتوای رنگیزه‌های فتوستنزی در گندم و جو شده است. در تحقیقی که تیمار نانو نقره روی ماش و سورگوم اعمال شده بود، افزایش میزان کلروفیل در غلظت‌های پایین گزارش شده است (Racuciu et al., 2008). افزایش محتوای کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئیدها در غلظت‌های پایین تحت تأثیر نانو ذرات نقره در گیاه سیب‌زمینی نیز مشاهده شده است (Rakosy et al., 2005). نتایج حاصل از این تحقیقات در موافقت با نتایج به دست آمده از این پژوهش است.

References

- Abou-Zeid, H. M. and Moustafa, Y. (2014) Physiological and cytogenetic responses of wheat and barley to silver nanopriming treatment. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology* 5(3): 265-78.
- Ali, A., Mohammad, S., Khan, M. A., Raja, N. I., Arif, M., Kamil, A. and Mashwani, Z. U. R. (2019) Silver nanoparticles elicited in vitro callus cultures for accumulation of biomass and secondary metabolites in *Caralluma tuberculata*. *Artificial cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 47(1): 715-724.
- Alimoradi, M., Jafararpoor, M. and Golparvar, A. (2013) Improving the keeping quality and vase life of cut *Alstroemeria* flowers by post-harvest nano silver treatments. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences* 6(11): 632-635.
- Alizadeh, M. (2011) A user manual on plant tissue and micropropagation. Compilation of Nowruz Publications. Gorgan, Iran.
- Arnon, D. I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 24(1): 1-15.
- Asghar, Gh., Mostajer, A., Sadeghi Ali Ebadi, H. and Nakhea, A. (2009) Effect of salicylic acid and silver nitrate on taxol production in *Taxus baccata*. *Journal of Medicinal Plants* 11(41): 74-82.
- Crişan, I. and Cantor, M. (2016) New perspectives on medicinal properties and uses of *Iris* sp. *Hop and Medicinal Plants* 24: 24-36.
- Da Silva, J. A. T. (2008) Floriculture, ornamental and plant biotechnology. Global Science Books. Kagawa University, Japan.
- Dorna, H., Gorski, R., Szopinska, D., Tytkowska, K., Jurga, J., Wosinski, S.

- and Tomczak, M. (2010) Effect of a permanent magnetic field together with the shielding of an alternating electric field on carrot seed vigor and germination. *Ecological Chemistry and Engineering* 17(1): 53-61.
- Ehsanpour, A. A. and Jones, M. G. K. (2001) Plant regeneration from mesophyll protoplasts of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar Delaware using silver thiosulfate (STS). *Journal of Sciences of the Islamic Republic of Iran* 12(2): 103-110.
- Ekhtiyari, R. and Moraghebi, F. (2012) Effect of nanosilver particles on salinity tolerance of cumin (*Cuminum cyminum* L.). *Journal of Plant Biotechnology* 25: 99-107.
- El-Temseh, Y. S. and Joner, E. J. (2012) Impact of Fe and Ag nanoparticles on seed germination and differences in bioavailability during exposure in aqueous suspension and soil. *Environmental Toxicology* 27(1): 42-49.
- Ghanati, F., Bakhtiaran, S., Parast, B. M. and Behrooz, M. K. (2014) Production of new active phytochemicals by *Achillea millefolium* L. after elicitation with silver nanoparticles and methyl jasmonate. *Biosciences Biotechnology Research Asia* 11(2): 391-399.
- Ghosh, A., McBrayer, Z. and O'Connor, M. B. (2010) The *Drosophila* gap gene giant regulates ecdysone production through specification of the PTH-producing neurons. *Developmental Biology* 347(2):271-8.
- Gouran, A., Jirani, M., Mozafari, A. A., Saba, M. K., Ghaderi, N. and Zaheri, S. (2014) Effect of silver nanoparticles on grapevine leaf explants sterilization at in vitro conditions. In 2nd National Conference on Nanotechnology from Theory to Application 1-6 Isfahan, Iran.
- Hosseinzadeh, A., Kalateh Jari, S., Zarin Ney, V., Mashhadi, M., Bujar, A. and Hosseinzadeh, S. (2014) Investigation of the effect of silver nanoparticles on the quality and longevity of rose cut flowers. *Plant and Ecosystem* 10(40): 73-85.
- Jacobs, J., Pokorny, M., Mangold, J. and Graves-Medley, M. (2011) Biology, ecology and management of yellow flag iris (*Iris pseudacorus* L.). Extension publication EB203, Montana State University Extension, Bozeman, MT, USA.
- Karami Mehrian, S., Heidari, R. and Rahmani, F. (2016) Effect of chemical synthesis silver nanoparticles on germination indices and seedlings growth in seven varieties of *Lycopersicon esculentum* Mill (tomato) plants. *Journal of Cluster Science* 27: 327-340.
- Kim, H. S., Kang, H. S., Chu, G. J. and Byun, H. S. (2008) Antifungal effectiveness of nano silver colloid against rose powdery mildew in greenhouses. In *Solid State Phenomena*. Trans Tech Publications 135: 15-18.
- Kim, J. S., Kuk, E., Yu, K. N., Kim, J. H., Park, S. J., Lee, H. J. and Cho, M. H. (2007) Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *nano medicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 3(1): 95-101.
- Lee, W. M., An, Y. J., Yoon, H. and Kweon, H. S. (2008) Toxicity and bioavailability of copper nanoparticles to the terrestrial plants mung bean (*Phaseolus radiatus*) and wheat (*Triticum aestivum*): plant agar test for water-insoluble nanoparticles. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* 27(9): 1915-1921.
- Lin, D. and Xing, B. (2007) Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. *Environmental Pollution* 150(2): 243-250.
- Mirzajani, F., Askari, H., Hamzelou, S., Farzaneh, M. and Ghassempour, A. (2013) Effect of silver nanoparticles on

- Oryza sativa* L. and its rhizosphere bacteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 88: 48-54.
- Monica, R. C. and Cremonini, R. (2009) Nanoparticles and higher plants. *Caryologia* 62(2): 161-165.
- Tengku Mohamad, T. A. S., Islahudin, F., Jasamai, M. and Jamal, J. A. (2019) Preference, perception and predictors of herbal medicine use among malay women in Malaysia. *Patient Prefer Adherence* 13: 1829-1837.
- Okba, M. M., Abdel Baki, P. M., Abu-Elghait, M., Shehabeldine, A. M., El-Sherei, M. M., Khaleel, A. E. and Salem, M. A. (2022) UPLC-ESI-MS/MS profiling of the underground parts of common Iris species in relation to their anti-virulence activities against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology* 10(282): 114658.
- Quiroz-Figueroa, F. R., Rojas-Herrera, R., Galaz-Avalos, R. M. and Loyola-Vargas, V. M. (2006) Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 86(3): 285-301.
- Racuciu, M., Creanga, D. and Horga, I. (2008) Plant growth under static magnetic field influence. *Romanian Journal of Physics* 53(1-2): 353-359.
- Raei, M., Angaji, S. A., Omid, M. and Khodayari, M. (2014) Effect of abiotic elicitors on tissue culture of *Aloe vera*. *International Journal of Bioscience* 5(1): 74-81.
- Rakosy-Tican, L., Aurori, C. M. and Morariu, V. V. (2005) Influence of near null magnetic field on *in vitro* growth of potato and wild Solanum species. *bioelectromagnetics: Journal of the Bioelectromagnetics Society, the Society for Physical Regulation in Biology and Medicine, the European Bioelectromagnetics Association* 26(7): 548-557.
- Razavizade, R. (2019) The effect of silver nanoparticles on the antioxidant capacity and total soluble protein pattern in tomato seedlings under *in vitro* culture. *Applied Biology* 32(3): 22-38.
- Sarmast, M. K. and Salehi, H. (2016) Silver nanoparticles: an influential element in plant nanobiotechnology. *Molecular Biotechnology* 58: 441-449.
- Sarmast, M. K., Niazi, A., Salehi, H. and Abolmoghdam, A. (2015) Silver nanoparticles affect ACS expression in *Tecomella undulata in vitro* culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 121(1): 227-236.
- Sharma, P., Bhatt, D., Zaidi, M. G. H., Saradhi, P. P., Khanna, P. K. and Arora, S. (2012) Silver nanoparticle-mediated enhancement in growth and antioxidant status of *Brassica juncea*. *Applied biochemistry and biotechnology* 167(8): 2225-2233.
- Slinkard, K. and Singleton, V. L. (1977) Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American journal of Enology and Viticulture* 28(1): 49-55.
- Spinoso-Castillo, J. L., Chavez-Santoscoy, R. A., Bogdanchikova, N., Pérez-Sato, J. A., Morales-Ramos, V. and Bello-Bello, J. J. (2017) Antimicrobial and hormetic effects of silver nanoparticles on *in vitro* regeneration of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) using a temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 129: 195-207.
- Sun, Sh., Liu, J., Zhang, M. and He, Sh. (2019) Simultaneous improving nitrogen removal and decreasing greenhouse gas emission with biofilm carrier's addition in ecological floating bed. *Bioresour Technol* 292(4): 121944.
- Sun, Y. C., Zhang, Y. J., Wang, K. and Qiu, X. J. (2006) NaOH scarification and stratification improve germination of *Iris lactea* var. *chinensis* seed. *HortScience* 41(3): 773-774.

- Sutherland, W. J. (1990) Biological flora of the British Isles: *Iris pseudacorus* L. Journal of Ecology 78: 833-848.
- Woisky, R. and Salatino, A. (1998) Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. Journal of Apicultural Research 37: 99-105.
- Zhang, F. Q., She, W. J. and Fu, Y. F. (2005) Effect of Nano-silver on cell division and mitotic chromosomes: a preface to siren. Geneva 40: 504-509.

