اثر نانو ذره‌های نقره و پراکسید هیدروژن در پیشگیری از آلودگی قارچی ریزنمونه‌های نوئل نروژی در شرایط درون شیشه‌ای

مهرناز زارعی[1*]، حسن صالحی[2]، ابوالفضل جوکار[3]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم باغبانی، دانشگاه شیراز، شیراز. ۲- استاد بخش علوم باغبانی، دانشگاه شیراز، شیراز. ۳- استادیار بخش علوم باغبانی، دانشگاه شیراز، شیراز.

*نویسنده مسئول: Zarei.mehr1391@yahoo.com

چکیده

یکی از دشواری‌های کشت بافت گیاهان چوبی به ویژه درختان بالغ سوزنی برگ، وجود آلودگی‌های قارچی و باکتریایی درونی در بافت‌های این گیاهان می‌باشد. به دلیل بالا بودن درصد آلودگی قارچی در ریزنمونه‌های گرفته شده از بافت‌های بالغ گیاه نوئل نروژی، در این پژوهش از نانو ذره‌های نقره و هیدروژن پراکسید با هدف حذف آلودگی‌های قارچی استفاده شد. روی هم رفته تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانو ذره‌های نقره به مدت ۱ ساعت غوطه‌وری ریزنمونه‌ها در مقایسه با سایر تیمارها مناسب‌تر بود، زیرا در کمترین زمان و با کمترین آسیب به بافت‌های گیاهی، بالاترین درصد مهار آلودگی قارچی در این تیمار مشاهده شد. هرچند بر اساس نتایج به دست آمده از این پژوهش، کاربرد هیدروژن پراکسید نتوانست در پیشگیری از آلودگی قارچی موثر باشد.

کلمات کلیدی: نانو ذره های نقره، Picea abies ، هیدروژن پراکسید، آلودگی

مقدمه

کنستانتین (۱۹۸۶) مشکل اساسی در فنون کشت درون شیشه ای گیاهان را، آلودگی‌هایی دانست که به وسیله ریزانداموارهها ایجاد می‌شوند. باکتری‌ها و قارچ‌ها از جمله مهم‌ترین ریزانداموارههایی هستند که در شرایط درون شیشه‌ای موجب آلودگی می‌شوند (Leifert and Casselles, 2001). گیاه نوئل نروژی (*Picea abies* (L.) H. Karst) به خاطر داشتن فلس‌های کوچک روی شاخه‌ها و نیز آرایش فشرده برگ‌های سوزنی، مکان مناسبی برای رشد آلودگی‌های قارچی می‌باشد. با توجه به این که نوع، غلظت و مدت زمان تیمار ماده گندزدا با نمونه گیاهی باید به صورت تجربی گزینش شود؛ بارها مشاهده شده که تیمار بیش از حد با مواد شیمیایی هرچند باعث نابودی کامل ریزانداموارهها شده است، اما پس از استفاده از این تیمارها بافت‌های گیاهی نیز به شدت دچار آسیب شده‌اند. همچنین برخی از ماده‌های شیمیایی گندزدا مانند کلرید جیوه با وجود موثر بودن، ماهیت سمی برای گیاهان داشته و کار با آن‌ها نیز دشوار است. بنابراین گزینش شرایط بهینه برای گندزدایی ریزنمونه‌های گوناگون گیاهی از اهمیت بسیاری برخوردار می‌باشد (Chawla, 2002; Hartmann *et al.*, 2002). محیط درون شیشه‌ای که مواد گیاهی در آن در حال رشد هستند، برای افزایش ریزانداموارهها نیز مناسب است. در بسیاری از موارد، رشد ریزانداموارهها بر رشد بافت‌های گیاهی غلبه می‌کند. سرعت رشد، تکثیر و ریشه‌دهی گیاهان آلوده کاهش می‌یابد. رفع آلودگی در گیاهان چوبی (به‌ویژه سوزنی برگان) با دشواری‌های بیشتری روبروست (Niedz and Bausher, 2002). آنتی بیوتیک‌ها و قارچکش‌هایی که برای رفع آلودگی در شرایط درون شیشه‌ای مورد استفاده قرار می گیرند همیشه موثر نیستند و از طرف دیگر ممکن است بر رشد گیاه اثر منفی بگذارند (Cuirong *et al.*, 2004). برای رفع آلودگی در شرایط درون شیشه ای ترکیب‌هایی مانند هیپوکلریت کلسیم، هیپوکلریت سدیم، هیدروژن پراکسید، اتیلن الکل، نیترات نقره، کلرید جیوه و آنتی بیوتیک‌ها استفاده می شود (Torres, 1989). ذره‌های نانو، به‌ویژه نانو نقره می‌توانند به طور همزمان نقش ضد باکتری و قارچکش را بازی کنند، همچنین استفاده ازین مواد دارای فوایدی چون هزینه کمتر، سادگی در کاربرد و پایداری بیشتر نسبت به سایر ترکیب‌های شیمیایی است (Habiba *et al.*, 2002, Brunner *et al.*, 2006). به

دلیل بالا بودن درصد آلودگی قارچی در ریزنمونه‌های گرفته شده از بافت‌های بالغ گیاه نوئل نروژی، در این پژوهش از نانو ذره‌های نقره و هیدروژن پراکسید با هدف حذف آلودگی‌های قارچی با هزینه کمتر و زمان کمتر استفاده شد.

مواد و روش‌ها

ریزنمونه‌ها از جوانه‌های انتهایی شاخه‌های با رویش جدید به طول ۳ تا ۴ سانتی‌متر از گیاهان ۱۵ ساله نوئل نروژی تهیه شد. برای گندزدایی سطحی ابتدا ریزنمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در محلول آب و مایع ظرف‌شویی به غلظت ۱٪ غوطه‌ور و پس از قرارگیری زیر آب جاری، ریزنمونه‌ها به دستگاه جریان هوای افقی انتقال یافته و پس از آن با الکل ۷۰٪ با تیمار زمانی ۶۰ ثانیه همراه با تیمار شاهد غوطه‌ور شدند و سپس با آب مقطر گندزدایی شده، شستشو شدند. در آزمایش اول ریزنمونه‌ها در تیمار محلول نانوذره‌های نقره با غلظت های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر در دو زمان ۱ و ۳ ساعت همراه با تیمار قرار گرفتند و سپس ۵ مرتبه با آب مقطرگندزدایی شده آبکشی شدند. در آزمایش دوم از پراکسید هیدروژن در سه غلظت (۴، ۸ و ۱۲ ٪) و زمان ۱۰ دقیقه استفاده شد. در هر دو آزمایش پس از کاربرد تیمارهای ضد قارچی، ریزنمونه‌ها در شیشه‌های کشت دارای محیط کشت PDA کشت شدند. پیش از اتوکلاو کردن محیط کشت (در فشار ۱/۵ بار و دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه)، pH با استفاده از NaOH ۱ نرمال و HCl ۰/۱ نرمال روی ۵/۸ تنظیم شد.

یادداشت برداری داده ها شامل درصد گندزدایی و درصد زنده مانی ریزنمونه‌ها بود. آزمایش‌استفاده از نانوذره‌های نقره به صورت فاکتوریل در قالب طرح به طور کامل تصادفی و همچنین آزمایش بررسی اثر پراکسید هیدروژن به صورت طرح به طور کامل تصادفی انجام شد. برای هر تیمار ۴ تکرار و در هر تکرار ۵ ریزنمونه در نظر گرفته شد . واکاوی آماری داده ها توسط نرم افزار SAS و مقایسه میانگین ها با آزمون LSD در سطح ۱٪ انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج استفاده از تیمارهای غوطه‌وری ریزنمونه‌ها در محلول‌های نانو ذره‌های نقره نشان داد که هر دو غلظت ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر در مهار آلودگی‌های قارچی موثر بود، به طوری که درصد آلودگی ریزنمونه‌ها به صفر رسید. اما با افزایش غلظت نانو ذره‌های نقره به ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر و همچنین با افزایش مدت زمان غوطه‌وری، درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌ها کاهش یافت. روی هم رفته تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانو ذره‌های نقره به مدت ۱ ساعت غوطه‌وری ریزنمونه‌ها در مقایسه با سایر تیمارها مناسب‌تر بود، زیرا در کمترین زمان و با کمترین آسیب به بافت‌های گیاهی، بالاترین درصد مهار آلودگی قارچی در این تیمار مشاهده شد (جدول ۱). بر اساس نتایج به دست آمده در جدول۲ ، میزان اثرگذاری تیمارهای H_2O_2 در پیشگیری از آلودگی قارچی بسیار ناچیز بود.

جدول ۱- مقایسه میانگین‌های اثر زمان‌ها و غلظت‌های گوناگون نانو ذره‌های نقره (غوطه‌وری به مدت ۱ و ۳ ساعت) بر میزان مهار آلودگی قارچی و میزان زنده‌مانی ریزنمونه‌های گیاه نوئل نروژی

نانو ذره‌های نقره (میلی‌گرم در لیتر)	زمان تیمار (ساعت)	درصد مهار آلودگی قارچی	میانگین اثر غلظت	میانگین اثر زمان	درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌ها	میانگین اثر غلظت	میانگین اثر زمان
۰	۰	۰^{c†}			۱۰۰^{a}		
۱۰۰	۱	۶۶/۶۶^{b}	۷۴/۹۸^{B}	۸۸/۸۹^{A}	۱۰۰^{a}	۱۰۰^{A}	۹۵^{A}
	۳	۸۳/۳^{ab}		۹۴/۴۳^{A}	۱۰۰^{a}		۸۸/۳۳^{B}
۲۰۰	۱	۱۰۰^{a}	۱۰۰^{A}		۱۰۰^{a}	۹۵^{AB}	
	۳	۱۰۰^{a}			۹۰^{b}		
۴۰۰	۱	۱۰۰^{a}	۱۰۰^{A}		۸۵^{b}	۸۰^{C}	

۳	۱۰۰[a]	۷۵[c]

همچنین مشاهده گردید که با افزایش غلظت این ماده، درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌ها به کمتر از ۵۰٪ کاهش یافت (جدول ۲). امروزه استفاده از نانو ذره‌های نقره برای پیشگیری از آلودگی‌های قارچی و باکتریایی گسترش یافته است (Salata *et al.*, 2004). همچنین گزارش شده که نانو ذره‌های نقره با اندازه ۱ تا ۵ نانومتر در پیشگیری از آلودگی قارچی موثر بوده است (Wainwright *et al.*, 1986). به دلیل کوچک شدن ذره‌های نقره و در نتیجه افزایش سطح به حجم آن‌ها اثرگذاری این ترکیب‌ها برای گندزدایی افزایش خواهد یافت. هرچند شکل، ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی و همچنین ساختار کلویید نانو ذره‌های نقره نیز از اهمیت بسیاری برخوردار می‌باشد (Zhang *et al.*, 2007). در این پژوهش با استفاده از تیمار غوطه‌وری در نانو ذره‌های نقره آلودگی قارچی به طور کامل مهار شد.

† در هر ستون میانگین‌های دارای حرف یکسان (حرف کوچک در برهمکنش‌ها و حرف بزرگ در اثرهای اصلی) تفاوت معنی‌دار با استفاده از آزمون LSD در سطح ۱٪ ندارند.

نوئل نروژی

غلظت H_2O_2 (درصد)	درصد آلودگی قارچی	درصد زنده‌مانی ریزنمونه
۰	۱۰۰[a†]	۱۰۰[a]
۴	۸۷/۵۰[a]	۶۲/۵[b]
۸	۷۵/۰۰[a]	۵۷/۵[b]
۱۲	۸۱/۲۵[a]	۴۵/۰[c]

† در هر ستون میانگین‌های دارای حرف یکسان تفاوت معنی‌دار با استفاده از آزمون LSD در سطح ۱٪ ندارند.

منابع

1. Ahmadi, E., Nasr, S., Jalilvand, H. and Savadkoohi, S. 2012. Contamination control of microbe *Ziziphus spina* [christti] seed in vitro culture. Trees, 26(4): 1299-1304.
2. Brunner, T., Wick, P., Manser, P., Spohn, P., Grass, R., Limbach, L., Bruinink, A. and Stark, W. 2006. In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility. Env sci tech, 40(14): 4374-4381.
3. Constantine, D. 1986. Micropropagation in the commercial environment.
4. Cuirong, Z. 2003. The bacteritic spectrum and drug resistance of bacillary dysentery.[J]. Zheji Clin Med J, 9: 016.
5. Habiba, K., Makarov, V., Weiner, B. and Morell, G. 2002. Fabrication of Nanomaterials by Pulsed Laser Synthesis, Manufacturing Nanostructures.
6. Jeong, S., Hwang, Y., and Yi, S. 2005. Antibacterial properties of padded PP/PE nonwovens incorporating nano-sized silver colloids. J Materials sci, 40(20): 5413-5418.
7. Leifert, C., and Cassells, A. 2001. Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. In Vitro Cell Dev Bio-Plant, 37(2): 133-138.
8. Niedz, R., and Bausher, M. 2002. Control of in vitro contamination of explants from greenhouse-and field-grown trees. In Vitro Cell Dev Bio-Plant, 38(5): 468-471.
9. Russell, A., Path, F., Sl, F. and Hugo, W. 1994. 7 Antimicrobial Activity and Action of. Prog med chem, 31: 351.
10. Salata, O. 2004. Applications of nanoparticles in biology and medicine. J Nanobiotech, 2(1): 3.
11. Taiz, and Zeiger. 2006. Plant Physiology 4th ed.: Sinauer Associates Inc.

12. Torres, K. C. 1989. Tissue culture techniques for horticultural crops: Van Nostrand Reinhold.
13. Wainwright, M., Grayston, S. and De Jong, P. 1986. Adsorption of insoluble compounds by mycelium of the fungus Mucor flavus. Enzy microbial tech, 8(10): 597-600.
14. Zhang, W., Qiao, X. and Chen, J. 2007. Synthesis of nanosilver colloidal particles in water/oil microemulsion. Colloids Surf A Physicochem Eng Asp, 299(1): 22-28.

Effects of silver nanoparticles and hydrogen peroxide on fungal disinfection of *Picea abies* (L.) H. Karst explants

M. Zarei[1*], H. Salehi[2], A. Jowkar[3]

1- M. Sc of Horticultural Science, Shiraz University, Shiraz. 2- Professor, Dep. of Horticultural Science, Shiraz University, Shiraz. 3- Associate Professor, Dep. of Horticultural Science, Shiraz University, Shiraz.

*Corresponding Author: Zarei.mehr1391@yahoo.com

Abstract

The fungal and internal bacterial contaminations are the major barrier that restricts the aseptic establishment of mature tissues of conifers. Providing a highly effective decontamination procedure in woody plants not only can accelerate final production time but also this eventually resulted in pathogen free plants. In present experiment we were looking for to find out the possible antimicrobial effects of hydrogen peroxide and silver nanoparticles solution to eradicate high fungal contaminants in mature micro-cutting explants of *Picea abies* (L.) H. Karst. Collectively, explants exposed by 200 mg/L of silver nanoparticles showed the lowest possible injury but the highest decontamination percentage in contrast to that of other treatment. These results reinforce the idea that AgNPs can be considered as an ideal compound for control of microbial contamination of Norway spruce *in vitro* culture techniques.

Key words: Contamination, AgNPs, H2O2, Norway spruce