تأثیر غلظت‌های مختلف اسید ایندول بوتیریک بر کالوس‌زایی نسترن وحشی استفاده از اسانس ها و نانو ذرات نقره به منظور گند زدایی ریزنمونه در شرایط درون شیشه ای

مینا تقی زاده [1*]، موسی سلگی [2]
1و2- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه اراک، اراک.
* نویسنده مسئول: مینا تقی زاده

چکیده

یک بخش مهم در کشتهای درون شیشه ای ضد گندزدایی ریز نمونه ها و حفظ شرایط استریل است. بطور ایده آل مواد ضد عفونی کننده باید بر دامنه گسترده ای از میکروبها در غلظت کم موثر باشند. امروزه استفاده از ترکیباتی نظیر اسانس های گیاهی و نانو ذرات به عنوان مواد ضد میکروبی در مطالعات میکروبیولوژی کاربرد دارند. هدف اصلی این آزمایش بررسی استفاده از نانو ذرات نقره، تیمول و کارواکرول به عنوان مواد ضد عفونی کننده در کشت درون شیشه ای چمن برموداگرس بود. تیمارهای تکمیلی گند زدایی شامل سه نوع ماده (نانو ذرات نقره، تیمول و کارواکرول) در غلظتهای مختلف ۳۰،۶۰ و 120 دقیقه و زمانهای ۳۰،۶۰ و 120 دقیقه بود. طبق نتایج بدست آمده، آلودگی ریز نمونه ها بطور موفقیت آمیزی با تیمارهای نانو ذرات نقره، تیمول و کارواکرول کنترل شدند. تیمول و کارواکرول به ترتیب بیشتر بر روی آلودگیهای باکتریای و قارچی موثر بودند. هیچ یک از تیمارها در تولید کالوس و بروز علائم نکروز شدن ریز نمونه ها تاثیری نداشتند. فعالیت ضدقارچی نانو ذرات نقره، تیمول و کارواکرول بستگی به غلظت و مدت زمان تیمارها داشت. بطور کلی این مواد بویژه نانو ذرات نقره به عنوان موادی جایگزین برای مواد شیمیایی متداول برای حذف و کنترل جمعیت های میکروبی ریز نمونه در شرایط درون شیشه ای، می توانند مورد استفاده قرار گیرند.

مقدمه

عملیات ضدعفونی کردن در شرایط درون شیشه ای، به معنای از بین بردن تمام ریزموجودات زنده شامل باکتریها، قارچ و اسپورهای آنها از ریزنمونه می باشد. به دلیل وجود منابع هیدروکربنی مانند ساکارز در محیط کشت درون شیشه ای، باکتریها و قارچها از مهمترین پاتوژن های مشکل ساز در کشت های درون شیشه ای هستند. اندام و بافتهای گیاهی توسط محلولهای مختلف گندزدا مانند هیپوکلریت کلسیم، هیپوکلریت سدیم، پراکسید هیدروژن، اتانول، نیترات نقره و کلرید جیوه و غیره ضدعفونی می شوند(Torres 1989). بطور کلی یک ماده ضدعفونی کننده ایده آل باید در غلظت های پایین و به فرم های مواد طبیعی بر علیه دامنه زیادی از میکروبها موثر باشد (Kumar, 2001). امروزه مقاومت باکتریها و قارچها به قارچ کشها و باکتری کشهای معمول عامل محدود کننده در گندزدایی مواد گیاهی و محیط کشت است. اغلب مواد شیمیایی ضد میکروبی سمیت زیادی برای موجودات دارند و امروزه توجه زیادی به استفاده از مواد جدید که ایمن و موثر نیز باشند، وجود دارد(Sondi and Salopek Sondi, 2004). یکی از این مواد نانو ذرات می باشند. سالهاست اثر سمیت زیاد ترکیبات بر پایه نقره بر روی ریزموجودات و اثرات کشندگی بر روی بسیاری از سویه های باکتری ها شناخته شده است (Sondi and Salopek Sondi, 2004). نسبت سطح به حجم ویژه در نانو ذرات نقره، واکنش کاتالیتیکی و فعالیت ضد میکروبی بسیار بالایی می باشد.(Navarro et al., 2008; Kim et al., 2007). بنابراین قابل انتظار است که نانو ذرات نقره نسبت به میکرو ذرات، یونهای نقره بیشتری را رها می کنند. از طرف دیگر، ترکیبات طبیعی مثل اسانس ها می تواند برای استفاده در کارهای ضد میکروبی بکار رود. اسانس ها جزء ترپنهای فراری هستند که بطور طبیعی توسط گیاهان آروماتیک تولید می شوند. برخی مطالعات نشان داده است که اسانس های استخراج شده گیاهی نظیر کارواکرول و تیمول ممکن است جایگزینی مناسب برای از بین بردن

میکروبهای مقاوم باشند. همچنین اینها یکسری مواد طبیعی هستند که علاوه بر ایمن برای سلامتی بشر، سازگار با محیط زیست نیز می باشند. سالهاست که برموداگرس (Cynodon dactylon) به عنوان یک چمن گرمسیر سازگاری به مناطق گرم و خشک مورد پژوهش های درون شیشه ای و بیوتکنولوژی قرار گرفته است. در اکثر موارد ترکیب هیپوکلریت و اتانول برای گند زدایی بافتهای رویشی برموداگرس به کار برده می شود (Qu et al. 2003; Lu et al. 2006). آزمایش های ابتدایی ما نشان داد که میزان آلودگی ریز نمونه ها گرفته شده از اندام های زیرزمینی بسیار زیاد است. بنابراین، هدف اصلی این آزمایش مطالعه جایگزین کردن احتمالی نانو ذرات نقره ، تیمول و کارواکرول به عنوان ترکیبات گندزدا در کشت درون شیشه ای برموداگرس بود.

مواد و روشها

استولونهای برموداگرس در مرحله رویشی که تحت شرایط کنترل شده گلخانه ای پرورش یافته بود در اواخر بهار جمع آوری شد. برگهای پیر حذف و استولن ها به قطعات دارای یک گره به طول 2 الی 3 سانتی متر بریده شدند. ابتدا قطعات گره ای در زیر آب جاری به مدت 20 دقیقه بهمراه 3-2 قطره مایع ظرفشویی خانگی شسته و تمیز شدند. سپس با اتانول 70 درصد به مدت یک دقیقه، سه بار شستشو با آب مقطر استریل، 15 دقیقه با مایع تجاری سفید کننده 30 درصد (2/5 درصد ماده فعال) ضد عفونی سطحی شدند و در نهایت با آب مقطر استریل سه مرتبه زیر هود آبکشی شدند. ریز نمونه ها با سه ترکیب نانو ذرات نقره (شرکت نانوسید، ایران)، تیمول (شرکت سیگما) و کارواکرول (شرکت مرک) در غلظتهای 100 و 200 میلی گرم در لیتر و زمانهای مختلف ۳۰،۶۰ و 120 دقیقه ضد عفونی شدند. پس از اعمال همه تیمارها، ریز نمونه ها 6 بار با آب مقطر استریل آبکشی شدند. تیمارهای ذکر شده با آب مقطر(3 بار شستشو با آب مقطر استریل و بدون هیچ گونه ماده ضد عفونی کننده) و روش متداول گندزدایی (اتانول بهمراه مایع سفید کننده) مقایسه شدند. درصد آلودگی باکتریایی و قارچی، میزان تولید کالوس و علائم نکروز شدن ریزنمونه ها از روز سوم پس از کشت ثبت شد. اندازه کلونی ها نیز از روز دهم پس از کشت بر اساس بیشترین قطر با خط کش اندازه گیری شد. بعد از ضدعفونی کردن ریزنمونه ها، قطعات گره در محیط دارای دو میلی گرم در لیتر 2,4-D کشت شدند. نمونه ها در شرایط 1± 24 درجه سانتی گراد به مدت 16/8 ساعت روشنایی/تاریکی به منظور تولید کالوس نگهداری شدند. این آزمایش به صورت طرح فاکتوریل در قالب کاملا تصادفی با 4 تکرار و 5 ریز نمونه در هر تکرار اجرا شد. اثرات ساده ماده ضد عفونی کننده، غلظت ماده ضد عفونی کننده، زمان ضدعفونی کردن و اثرات متقابل آنها بر روی صفات درصد آلودگی باکتریایی و قارچی، زمان ظهور کلونی ها، میزان تولید کالوس و علائم نکروز شدن ریزنمونه ها بررسی شد. داده ها با ANOVA و با استفاده از نرم افزار SAS تجزیه شد.

نتایج و بحث

جدول تجزیه واریانس نشان داد که اثرات ساده ماده ضد عفونی کننده بر روی زمان ظهور آلودگی، درصد آلودگی قارچی و باکتریائی، درصد کل آلودگی، قطر کلونی، تولید کالوس و میزان نکروز شدن ریز نمونه ها در سطح 5 درصد معنی دار بود. همچنین اثرات متقابل ماده ضدعفونی کننده در غلظت بر روی ظهور کلونی و درصد آلودگی در سطح 1 درصد معنی دار بود. در غلظت100 میلی گرم در لیتر کارواکرول بیشترین درصد آلودگی کل (55/6%) در ریز نمونه ها اتفاق افتاد (جدول1). تیمار 200 میلی گرم در لیتر با نانوذرات نقره درصد آلودگی کل(11/1%) خصوصا آلودگی قارچی (صفر درصد) را به شدت کاهش داد. بیشترین درصد آلودگی باکتریایی (37/8%) ریز نمونه ها در تیمار 100 میلی گرم در لیتر تیمول و 200 میلی گرم در لیتر تیمول (36/7%) حاصل شد.

جدول 1- اثر متقابل عامل ضدعفونی کننده و غلظت بر ضدعفونی ریزنمونه های برموداگراس

Diameter (mm)	Total Infection (%)	Treatment	Appearance (days)	Infection (%)

	Fungi	Bacteria	Fungi	Bacteria	Fungi	Bacteria
نانوذرات نقره						
100 (mg l-1)	5.3c	8.2a	24.4c	8.9c	15.2b	1.1c
200 (mg l-1)	10a	7.3ab	0d	11.1c	0c	1.2c
تیمول						
100 (mg l-1)	3.8d	8.8a	37.8b	4.4c	35a	0.7c
200 (mg l-1)	8.2b	4.1cd	8.9d	36.7ab	5.8c	6.8ab
کارواکرول						
100 (mg l-1)	3.2d	5.6c	33.3bc	22.2bc	36.3a	5.9ab
200 (mg l-1)	9.2ab	3d	2.7d	33.9ab	2.6c	7.7a
روش متداول	3d	5.7bc	26.7bc	20bc	18.3b	3.2bc
آب مقطر	3d	4cd	100a	40a	31.8a	5abc

	Diameter (mm)	Total Infection (%)	Treatment	Appearance (days)	Infection (%)
			Bacteria	Fungi	Fungi
نانوذرات نقره					
	30	5.7c	16.7bc	12.3 b	35.8bcd
	60	8.8a	10c	5.3b	16.7d
	120	9a	10c	5.2b	14.2d
تیمول					
	30	5.2cb	36.7 b	26.2 ab	56.7b
	60	6.8 ab	23.3cb	22 ab	38.3bcd
	120	7.5 ab	10c	15ab	33.3bcd
کارواکرول					
	30	3.5 c	23.3cb	30.6a	57.5b
	60	4c	20.8cb	14.2ab	50.8bc
	120	5.3cb	10c	13.5ab	30cd
روش متداول		5.7cb	26.7cb	18.3ab	46.7bc
آب مقطر		4c	100a	31.8a	100a

نتایج جدول تجزیه واریانس نشانگر آن بود که اثرات متقابل ماده ضد عفونی کننده در زمان در معرض قرار گرفتن ریزنمونه ها با ماده ضد عفونی کننده، ظهور آلودگی باکتریایی، قارچی، قطر کلونی قارچ و آلودگی کل ریز نمونه ها از نظر آماری در سطح 1 درصد معنی دار بود. با توجه به اثرات متقابل ماده ضد عفونی کننده در زمان تیمار (جدول2)، بالاترین درصد آلودگی کل (57/5%) در تیمار 30 دقیقه کارواکرول و کم ترین آلودگی (14/2%) در تیمار 120 دقیقه نانوذرات نقره به دست آمد. افزایش مدت زمان تیمارهای نانوذرات نقره و تیمول، زمان ظهور کلونی های باکتریایی (7/5 الی 9 روز) را در مقایسه با آب مقطر و روش متداول (4 الی 5/7 روز) به تاخیر انداخت. همچنین افزایش مدت زمان تیمار با نانوذرات نقره (120-60 دقیقه) منجر به کنترل بهتر آلودگی کل (16/7%- 14/2%) در مقایسه با آب مقطر و روش متداول (100%- 46/7%) شد.

جدول 2- اثر متقابل عامل ضدعفونی کننده و زمان در معرض قرار گرفتن بر ضدعفونی ریزنمونه های برموداگراس

بدست آوردن مواد گیاهی عاری از پاتوژن در کشت های درون شیشه ای بسیار دشوار است و عوامل بسیاری مانند تفاوت میکروارگانیسم های موجود، غلظت و ماهیت مواد ضد عفونی کننده و مدت زمان تیمار بر کارایی گندزداها تاثیر می گذارند. نتایج این آزمایش نشان داد که استفاده از نانوذرات نقره و اسانس ها به عنوان دو عامل ضد میکروبی بطور موفقیت آمیزی می تواند از آلودگی ریز نمونه ای گره ای برمودا‌گرس درشرایط درون شیشه ای جلوگیری نمایند. زمانیکه نانوذرات نقره برای ضدعفونی مورد استفاده قرار گرفت رشد قارچها و باکتریها بخوبی مهار شد. یونهای نقره به شدت با گروه های تیول آنزیم حیاتی و پروتئین ها برهمکنش دارند و با غیر فعال کردن آنها و بر هم زدن متابولیسم منجر به مرگ سلولهای باکتری می شوند. زمانیکه یون های نقره به شکل نانوذرات در می آیند، انتظار می رود که فعالیت ضد میکروبی بالایی را به دلیل دارا بودن سطح ویژه بزرگتر در مقایسه با فلز نقره در حالت مولکولی نشان دهند. طبق نتایج کنترل آلودگی بستگی به غلظت و زمان در معرض قرار گرفتن ریز نمونه با مواد ضد عفونی کننده دارد. به نظر می رسد که این ماده می تواند اثرات ضد میکروبی خوبی در کاهش فاکتورهای رشدی قارچ از جمله قطر کلونی، زمان ظهور و رشد کلونی هستند. این نتایج با مطالعات بدست آمده توسط عبدی و همکاران (2007) و رستمی و شهسوار (2009) مطابقت داشت. تیمارها هیچ اثر منفی بر القا کالوس و بروز علائم نکروز در ریزنمونه ها نداشتند و هیچ تفاوت معنی داری بین تیمارهای مختلف در مقایسه با شاهد (آب مقطر و روش متداول ضد عفونی) دیده نشد. عبدی و همکاران نیز طی مشاهدات زمانیکه محلول نانوذرات نقره را برای ضد عفونی ریزنمونه های سنبل الطیب در شرایط درون شیشه ای بکار بردند، هیچگونه علائم منفی بر روی رشد ریزنمونه ها گزارش نکردند. نتایج این مطالعه نشان داد که تیمول و کارواکرول پس از نانوذرات نقره رشد آلودگی را توانستند در برخی از تیمارها بویژه آلودگی های قارچی مهارکنند. براساس اظهارات لوزین و همکاران (2007) ترکیبات اسانس ها مانند تیمول دارای خاصیت ضد میکروبی و کارواکرول خاصیت ضدقارچی است. به نظر می رسد که تیمول و کارواکرول به دلیل دارا بودن ترکیبات فنولی و گروه هیدروکسیل بر روی دیواره سلول های میکروبی و اجزای سازنده آنها عمل می کنند. ضدعفونی ریزنمونه های گره ای برمودا‌گرس توسط تیمارهای تیمول و کارواکرول بیشتر آلودگی های قارچی را کنترل نمود تا آلودگی های باکتریایی. نوبلوچ وهمکاران اشاره کردند (1989) که تفاوت در میزان ضد قارچی اسانس ها به نظر می رسد بستگی به میزان حلالیت در آب و خواص چربی دوستی آنها است . فعالیت ضد قارچی اسانس ها به غلظت آنها بستگی دارد. بهترین ترکیب پیشنهادی طبق نتایج این پژوهش به منظور کنترل آلودگی های قارچی و باکتریایی قابل قبول و بدون هیچ گونه اثرات سوء بر رشد ریز نمونه برمودا‌گرس در شرایط درون شیشه ای، تیمار ریز نمونه ها با 200 میلی گرم در لیتر نانو ذرات نقره به همراه 100 میلی گرم در لیتر تیمول به مدت 60 دقیقه است.

References

Abdi G, Salehi H and Kush-Khui M (2008) Nano silver: a novel nanomaterial for removal of bacterial contaminants in valerian (Valeriana officinalis L.) tissue culture. 30: 709-714.

Kim, J.S., Kuk, E., Yu, K.N., Kim, J-H., Park, S.J., Lee, H.J., Kim, S.H., Park, Y.K., Park,Y.H., Hwang, C-Y., Kim, Y-K., Lee, Y-S., Jeong, D.H., Cho, M-H., 2007. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine. 3, 95 – 101.

Kumar U. 2001. Methods in Plant Tissue Culture. Second Resived and enlarged edition. Agrobios (India).

Lu S., Wang Z., Peng X., Guo Z., Zhang G. & Han L: An efficient callus suspension culture for triploid bermudagrass (Cynodon transvaalensis × C. dactylon) and somaclonal variations. Plant Cell Tiss Organ Cult. 2006: 87: 77-84.

Navarro, E., Baun, A., Behra, R., Hartman, N.B., Filser, J., Miao AJ., Quigg, A., Santschi, P.H., Sigg, L., 2008. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nonoparticles to algae, plants, and fungi. Ecotoxicology. 17, 372-386.

Qu R.L., Li D.R. & Qu R. 2003. Lead uptake by roots of four turfgrass species in hydroponic cultures. HortScience.: 38: 623-6290.

Rostami AA and Shahsavar A (2009) nano-Silver Particles Eliminate the in vitro Contamination of Olive 'Mission' Explants. Asian Journal of Plant Sciences. 8: 505-509.
Sondi I, Salopek-Sondi B (2004) Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study as a model for Gram-negative bacteria. J. Colloid Interface Sci. 275: 177-182.
Sondi, I., Salopek-Sondi, B., 2004. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. J Colloid Interface Sc. 275, 177–82.
Torres K T (1989) Tissue Culture Techniques for Horticultural Crops. Published by Van Nostrand Reinhold, New Yourk.

The application of essential oils and silver nano particles for explant sterilization in in vitro culture

M. Taghizadeh1* and M. Solgi 2
1,2- Dept. of horticultural science, Arak University, Arak, Iran
*Corresponding author: M. Taghizadeh

Abstract
The tedious part of plant in vitro techniques is sterilizing materials and maintaining aseptic conditions. Nowdays, use of compounds such as Essential Oils (EOs) and nano particles could be used as antimicrobial agent. The main objective of this experiment was aimed to studying the substitution probability of SNPs, thymol and carvacrol as novel sterilization agents in tissue culture of bermudagrass. Sterilization complementary treatments (SNPs, thymol and carvacrol) were applied at different concentrations (100 and 200 mg l-1) and exposure times of 30, 60 and 120 min. According to the results, infection of bermudagrass explant was controlled successfully by SNPs, thymol and carvacrol. All treatments were not affected on producing callus and necrosis signs of explants. These novel agents specially SNPs, could be used as an alternative to common chemicals treatment for elimination and control microbial population explant in the in vitro conditions.