کاربرد نانو ذرات نقره در کنترل آلودگی میکروبی و کیفیت اندام زایی درون شیشه‌ای پرتقال

مالک قاسمی [1*]، نعیمه حسینی [2]، مهسا هاشمی سجادی [2]، یحیی تاجور [1]

1- اعضاء هیئت علمی و استادیار مؤسسه تحقیقات مرکبات کشور، رامسر. 2-کارشناسان ارشد مؤسسه تحقیقات مرکبات کشور.

*نویسنده مسئول : مالک قاسمی Malek_ghasemi@yahoo.com

چکیده

از جمله مشکلات عمده ای که در تکنیک کشت بافت گیاهان وجود دارد می توان به آلودگی میکروبی کشتها اشاره کرد. از طرفی استفاده از ترکیباتی چون آنتی بیوتیک‌ها به دلیل دارا بودن اثرات فیتوتوکسیک و بازدارنده رشد گیاه و نیز احتمال ایجاد مقاومت در باکتری ها، چندان مورد استقبال قرار نمی‌گیرد. در این پژوهش، که در قالب طرح کاملا تصادفی و در 3 تکرار انجام شد، ریزنمونه‌های جوانه‌جانبی از درختان پرتقال تامسون ناول تهیه شدند و پس از استریل سطحی با هیپوکلریت سدیم 10%، به مدت یک ساعت در غلظتهای 50 و 100 ppm از کلوئید حاوی نانوذرات نقره قرار گرفتند. در تیمار شاهد، تنها استریل با هیپوکلریت سدیم انجام شد. ریز نمونه‌ها در محیط کشت Ms قرار گرفتند. بررسیها نشان داد که هر چند حدقل میزان آلودگی در تیمار 100 ppm بوده، اما در این غلظت، بیشترین آسیب به ریزنمونه‌ها وارد گشته است. تیمار 50 ضمن مهار آلودگی، تاثیر قابل توجهی بر تعداد و طول شاخساره های جدید، تعداد برگ و نیز بهبود کیفی آنها داشت که می تواند مربوط به اثرمهارکننده نقره بر عملکرد اتیلن باشد.

کلمات کلیدی: تامسون ناول، کشت بافت، نانوذرات نقره، آلودگی میکروبی، اتیلن.

مقدمه

به کمک تکنیک کشت بافت می‌توان احتمال شیوع انواع بیماریهای ویروسی و شبه ویروسی را که در روش‌های رایج ازدیاد رخ می‌دهد تا حد چشمگیری کاهش داد و تولید انبوه گیاهان عاری‌ازویروس را نهادینه کرد، چاترودی و همکاران(1974). به این منظور روش استفاده از مریستم نوک شاخساره بعنوان پیوندک، جهت ریز پیوندی، راه حل مناسب و ایمنی تلقی می‌شودو خان (2007). زیرا از آنجایی که راه اصلی انتقال این عوامل بیماری‌زا شیره نباتی موجود در آوندها است با انجام پیوند مریستم نوک شاخساره که فاقد آوند می‌باشد، بر روی پایه بذری متحمل، گیاه سالم تولید خواهد شد. از جمله مشکلات این روش، عدم دسترسی به مریستم در حال رشد در تمام طول سال است; زیرا در شرایط طبیعی، تولید شاخساره جدید به فصول خاصی از سال محدود می‌شود. لذا با بررسی روشهای مناسب تولید و تکثیر شاخساره پیوندک مورد نظر درشرایط درون شیشه‌ای، که هدف نهایی این پژوهش می‌باشد، تولید انبوه نهال‌های سالم تسهیل و تسریع خواهد شد. به این منظور بررسی کنترل آلودگی ریزنمونه‌های تهیه شده از شاخساره‌های درختان پرتقال رقم تامسون ناول، با استفاده از انواع مواد ضد عفونی کننده بررسی شد. تر کیبات نقره دارای پتانسیل بالایی در پیشگیری از آلودگی‌های میکروبی می‌باشد. یکی از مهم ترین این مواد، نانو نقره می‌باشد. به عقیده نومیا و همکاران1،(2004) و سوندی و سالوپک سوندی3،(2004) نانونقره دارای ویژگی‌های ضد باکتریایی، ضد قارچی و ضد ویروسی می‌باشد. این ماده، از طریق بر هم کنش با فرآیندهای مولکولی بسیاری در میکروارگانیسم ها، تأثیر قابل توجهی بر جلوگیری از رشد و کاهش آلودگی از طریق مرگ سلولی دارد. مدت زمان تماس و همچنین دما می تواند بر میزان و وسعت

۱- Nomiya *et al*
۳- Sondi and Salopek Sondi
٤- Dibrov *et al*
٥- Abdi *et al*

فعالیت ضد میکروبی نانو نقره اثر بگذارد (دیبرو و همکاران4، 2002). مکانیسم عمل به غلظت مورد استفاده از این ترکیب و حساسیت گونه‌های میکروبی به نقره بستگی دارد. عبدی و همکاران5، (2008).

مواد و روش ها

این پژوهش در محل آزمایشگاه کشت بافت مؤسسه تحقیقات مرکبات کشور واقع در رامسر انجام شده است. مواد آزمایشی پس ازحذف آلودگی ظاهری شاخساره‌ها به 3-2 قطعه تقسیم شدند به گونه‌ای که هر قطعه دارای حدود 2 تا 3 گره بود.. پس از شستشوی ریزنمونه‌ها با آب فراوان .و ضدعفونی فیزیکی، ریزنمونه‌ها به منظور انجام ضدعفونی شیمیایی به زیر هود لامینار منتقل شدند. ابتدا ضدعفونی با الکل 70 درصد به مدت 30 ثانیه انجام شد. سپس، به منظور دستیابی به بهترین شرایط ضدعفونی، 8 تیمار اعمال شد. در 4 مورد از این تیمارها تنها از ماده ضدعفونی کننده هیپوکلریت سدیم 10 درصد (با نام تجاری گلرنگ و حاوی حدود 5/5 درصد کلر فعال) استفاده شد. در 4 مورد دیگر پس از 20 دقیقه ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم 10 درصد، به مدت 1 ساعت از ماده ضدعفونی کننده نانونقره (با نام تجاری نانوسید و محصول شرکت نانونصب پارس) با غلظت‌های 50 ppm و 100، مطابق جدول 1 استفاده شد. در هر تیمار دو حالت آبشویی و عدم آبشویی در مرحله پایانی نیز اعمال گشت. در تیمارهایی که از نانونقره استفاده شد، به منظور جلوگیری از تشکیل رسوب AgCL و احیاناً کاهش عملکرد نانونقره، پس از اتمام ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم، 3-2 بار شستشو با آب مقطر استریل انجام شد تا بقایای کلر کاملاً شسته شود.

جدول (1) روش‌های ضدعفونی ریزنمونه

تیمار	روش ضدعفونی
روش 1	هیپوکلریت سدیم 10% - '20 (بدون آبشویی نهایی)
روش 2	هیپوکلریت سدیم 10% - '20 (با آبشویی)
روش3	هیپوکلریت سدیم 10% - '30 (بدون آبشویی)
روش 4	هیپوکلریت سدیم 10% - '30 (با آبشویی)
روش 5	هیپوکلریت سدیم 10% - '20 + 50 ppm نانونقره (بدون آبشویی)
روش 6	هیپوکلریت سدیم 10% - '20 + 50 ppm نانونقره (باآبشویی)
روش 7	هیپوکلریت سدیم 10% - '20 + 100 ppm نانونقره (بدون آبشویی)
روش 8	هیپوکلریت سدیم 10% - '20 + 100 ppm نانونقره (باآبشویی)

پس ازکشت انتقال آنها به اتاقک رشد صورت گرفت. دمای اتاقک رشد بر روی $24^{+}_{-}2$، به همراه فتوپریود 16 ساعت روشنایی و شدت نور حدود 2037 لوکس تنظیم شد. به مدت 4 هفته، نمونه‌ها در شرایط فوق نگهداری شدند و به طور منظم و دوره ای صفت‌های مورد نظر شامل درصد آلودگی، درصد نمونه‌های زنده، تعداد شاخساره‌های تولید شده و طول آنها، تعداد برگ ها و میزان ریزش آنها و همچنین کیفیت رشد شاخساره‌ها بررسی و یادداشت برداری شد. برای اندازه گیری طول نوشاخه‌ها، از خط کش استفاده شد. تعداد نوشاخه‌ها با شمارش به دست آمد، اما تنها نوشاخه‌هایی که طولی بیش از 5 mm داشتند آمارگیری شدند. در مورد تعداد برگ ها نیز آمارگیری نهایی با شمارش تعداد برگ‌های باز انجام شد.بررسی کیفیت رشد براساس ویژگی‌های ظاهری همچون شادابی نوشاخه‌ها و رنگ و حالت برگ ها به صورت امتیاز دهی از 1 تا 5 صورت گرفت. به این ترتیب به نمونه‌ای که هیچ گونه رشدی نداشت امتیاز 1 تعلق گرفت و به نمونه‌ای که بهترین شرایط ظاهری را داشت، امتیاز 5 داده شد.

به منظور تعیین بهترین تیمارها، آزمایش‌ها در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی، اجرا و بررسی شد. تیمارها در 8 سطح و 3 تکرار اعمال شد. تجزیه و تحلیل کلیه داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS، نسخه 9,2 انجام شد. مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون

چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال 0/05 صورت گرفت. در مواردی که تجزیه واریانس پس از تبدیل داده‌ها انجام شد، برای تفسیر نتایج و تنظیم جدول و نمودارهای مقایسه میانگین از داده‌های اصلی استفاده شد. رسم نمودارهای مربوطه نیز به کمک نرم افزار اکسل 2003 تحت ویندوز انجام شد. بررسی اثر روشهای مختلف ضدعفونیتأثیر 8 روش مختلف ضدعفونی ریز نمونه‌ها برروی صفاتی همچون میزان آلودگی کشت ها، میزان آلودگی‌های قارچی، باکتریایی و آلودگی توأم قارچی و باکتریایی، تعداد نمونه‌های زنده، تعداد شاخساره‌های حاصل و طول آنها، تعداد برگ ها، میزان ریزش برگ ها و کیفیت رشد ریزنمونه‌ها، براساس نتایج تجزیه واریانس (جدول 2) مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت.

نتایج و بحث

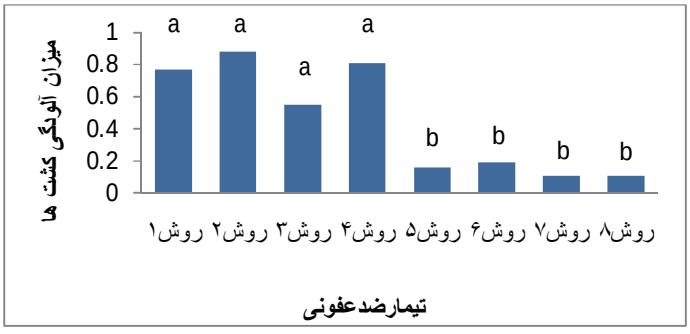
جدول (2): نتیجه تجزیه واریانس اثر تیمارهای مختلف ضدعفونی بر روی صفات اندازه گیری شده

منابع تغییرات	درجه آزادی(df)	میانگین مربعات صفات اندازه گیری شده								
		میزان آلودگی	قارچ	باکتری	کلی	نمونه زنده	تعداد شاخه	تعداد برگ	طول شاخساره	ریزش برگ	کیفیت رشد
روش ضدعفونی	7	0/06**	0/026**	0/018**	0/0088	0/059**	0/204**	0/827**	0/362**	0/033**	0/257**
خطای آزمایش	16	0/006	0/004	0/004	0/003	0/006	0/014	0/113	0/093	0/003	0/064
ضریب تغییرات		6/66	6/18	5/93	5/15	5/98	9/04	20/34	19/98	4/78	14/24

*: معنی دار در سطح احتمال 5%

**: معنی دار در سطح احتمال 1%

براساس نتایج تجزیه واریانس (جدول 2)، اثر روشهای مختلف ضدعفونی ریزنمونه‌ها برمیزان آلودگی کشتها در سطح احتمال 1% دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشد. بیشترین میزان آلودگی (88 %) مربوط به روش 2 (ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم 10% ـ20 دقیقه همراه با آبشویی پایانی) و کمترین میزان آلودگی (11 %) مربوط به تیمارهای حاوی 100ppm از محلول نانوذرات نقره (NS) می‌باشد(نمودار 1)[1].



نمودار(1): اثر روشهای مختلف ضدعفونی برمیزان آلودگی کشت ها

[1] - در کلیه جداول و نمودارهای مربوط به مقایسه میانگین‌ها، تیمارهایی که دارای حروف مشابه می‌باشند، در سطح احتمال 5% آزمون چند دامنه ای دانکن، تفاوت معنی داری با هم ندارند، در حالی که حروف غیر مشابه به معنی وجود اختلاف معنی دار بین تیمارهاست.

همچنین، تعداد ریزنمونه‌های زنده، به طور معنی داری در سطح احتمال 1% تحت تأثیر تیمار با روشهای مختلف ضدعفونی قرار دارد (جدول 2). با توجه به نتایج مقایسه‌میانگین آزمون دانکن در روشهای 5 و 6 (استفاده از هیپوکلریت سدیم به همراه 50ppm NS)، 100% نمونه‌ها زنده ماندند. درحالیکه در روش 7 (استفاده از هیپوکلریت سدیم همراه با NS100 ppm ـ بدون آبشویی) هیچ نمونه ای زنده نماند (جدول 3).نتایج بیانگر این است که اثر روشهای مختلف ضدعفونی، برروی تعداد شاخساره‌های تولید شده به ازاءریزنمونه درسطح احتمال 1% معنی دار است (جدول 2). مقایسه میانگین داده‌ها، حاکی از بیشترین تولید شاخساره در روشهای 5 و 6 (استفاده از هیپوکلریت سدیم به همراه NS 50 ppm) است. در روش 7 (استفاده از NS 100 ppm بدون آبشویی) تولید شاخساره جدید دیده نشد.

منابع

اهری، حامد و همکاران. 1387.نانوتکنولوژی در پزشکی و دامپزشکی. سازمان انتشارات جهاد دانشگاهی واحد تهران.

Abdi, Gh,. Salehi, H and Khosh-Khoi. M 2008. Nano silver: a novel nanomaterial for removal of bacterial contaminants in valerian (Valeriana officinalis L.) tissue culture. Acta Physiol Plant, 30: 709-714.

Chaturvedi, H.C. , G. C. Mitra. 1974. Clonal propagation of citrus from somatic callus culture. Hort Science. 9: 118-120

Dibrov P. et al. (2002). Chemiosmotic mechanism of antimicrobial activity of Ag(+) in Vibrio cholerae. Antimicrob Agents Chemother, 46: 2668-70. 7-

Khan, I. 2007. Citrus Genetics,Breeding and Biotechnology. CAB International PP: 370.

Nomiya, K., Yoshizawa, A., Tsukagoshi, K., Kasuga, N. C., Hirakawa, S. & Watanabe, J. (2004). J. Inorg. Biochem. 98, 46-60.

I. Sondi, B. Salopek-Sondi / Journal of Colloid and Interface Science 275 (2004) 177–182

Using of Silver nanoparticles for controlling microbial contamination and disinfection in vitro organogenesis of sweet orange(Citrus sinensis [L.] Osbeck)

Malek ghasemi, naime hoseini, mahsa hashemi sajadi, yahya tajvar
Iran Citrus Research Institute- seed and plant inproovement dep- Ramsar- Iran

Abstract
Among the major problems that exist in the plant tissue culture techniques can include microbial contamination of cultures. However, due to the effects of compounds such as antibiotics and inhibitors phytotoxic growth and development of resistance in bacteria is not much appreciation. In this study, which was conducted as a completely randomized design in 3, replication explants were prepared lateral shoots Navel orange trees and then surface sterilized with 10% sodium hypochlorite for one hour at concentrations of 50 and 100 ppm of colloidal Silver nanoparticles were. The control treatment was only sterilized with sodium hypochlorite. explants were placed in Ms medium. Results Showed that the infection rate in the treatment 100 ppm was lower, but this concentration has the most damage to the explants. 50 ppm treatment also inhibited infection, significant effect on the number of new shoots, number of leaves that can improve their quality. that Could be related to the ethylene inhibitor effect of silver.
Keywords: Thompson novel, tissue culture, silver nanoparticles, microbial contamination, ethylene.