بررسی اثر نانوذرات نقره روی ضدعفونی سطحی ریزنمونه انگور *Vitis vinifera* L. در شرایط درون شیشه‌ای

علی گوران [۱*]، علی اکبر مظفری [۲]، ناصر قادری [۲]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی علوم باغبانی دانشگاه کردستان، سنندج. ۲- استادیار گروه مهندسی علوم باغبانی دانشگاه کردستان، سنندج.

* نویسنده مسئول: علی گوران - kinggouran@gmail.com

چکیده

در این تحقیق با ضدعفونی ریزنمونه‌های برگی انگور(Vitis vinifera L.) دو رقم "خوشناو" و " فرخی"، توسط نانوذرات نقره، تاثیر نانوذرات نقره برای ضدعفونی سطحی در فرایند کشت بافت مورد آزمایش قرار گرفتند. تیمارها شامل استفاده از هیپوکلرید سدیم به همراه غلظت‌های یک و پنج پی‌پی‌ام نانوذرات نقره در دو زمان یک و سه دقیقه و تیمارهای نانوذرات نقره با غلظت ده پی‌پی‌ام در دو زمان یک و سه دقیقه بدون استفاده از هیپوکلرید سدیم بود. نانوذرات نقره درکنترل آلودگی‌های باکتریایی اثر متوسط تا خوبی را نشان داد، اما در کنترل آلودگی‌های قارچی ضعیف عمل نمود.

Effect of Silver Nanoparticles On Grape(Vitis vinifera L.) Explants Sterilization In In vitro Conditions

A.Gouran[1], A.A.Mozafari[1] and N.Ghaderi[1]

1- Dept. of Horticultural Sciences, University of Kurdestan, Sanandaj- Iran.

* Corresponding author: Ali Gouran - kinggouran@gmail.com

Abstract

In this study leaf explants of grape (cv. "Khoshnave" and "Farkhi") disinfected by silver nanoparticles. Silver nanoparticles used for disinfection of explants surface in the process of tissue culture. In this study silver nanoparticles (1 and 5 ppm) + sodium hypochlorite and silver nanoparticles (10 ppm) without sodium hypochlorite used for surface disinfection during 1 and 3 minutes. Silver nanoparticles treatments had moderate and high effect on bacterial contamination control, but had low effect for fungi contamination control.

مقدمه

از هزاران سال قبل ایرانیان برای نگهداری و سالم ماندن آب آشامیدنی از ظروف نقره استفاده می‌نمودند(Fraise et al., 2012). در چند دهه اخیر نیز نقره به عنوان یک ضدعفونی کننده بر علیه میکروارگانیسم‌های مضر مورد استفاده قرار می‌گیرد(Chambers et al., 1962). نانوذرات نقره دارای ویژگی ضد باکتریایی بسیار قدرتمند هستند(Sondi and Salopek-Sondi, 2004; Chamakura et al., 2011; Rajabi et al., 2011) و از آن به طور معمول به صورت روکش و پوشش ضدمیکروبی بر روی سطوح چوبی، پلاستیکی و .. استفاده می‌کنند(Oldenburg, 2011)، اما پتانسیل آن برای استفاده در کنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی به خصوص در شرایط درون شیشه‌ای، چندان مورد بررسی و پژوهش قرار نگرفته است.

انگور از مهم‌ترین محصولات اقتصادی کشاورزی در دنیا است و برای اصلاح ژنتیکی آن نیاز به روش‌های فوق پیشرفته کشت بافت است. پیشگیری و کنترل آلودگی‌های میکروبی در کشت بافت‌های گیاهی برای موفقیت کار از عوامل حیاتی محسوب می شود(Reed and Tanprasert, 1995). آلودگی میکروبی از مهم‌ترین عوامل از بین رفتن گیاهان کشت شده در شرایط درون شیشه‌ای محسوب می‌شوند(Buckley et al., 1995)، این میکروارگانیسم‌ها با گیاهان کشت شده بر سر تغذیه رقابت می‌کنند و با افزایش تراکم و تولید ترکیبات سمی، سبب افزایش مرگ و میر، نوسان در رشد، نکروز بافت، کاهش شاخه‌زایی و ریشه دهی و به طور کلی سبب کاهش بازده تولید و حتی بازدارندگی کامل، از کشت می‌گردند(Leifert et al., 1989; Çolgecen et al., 2011). ضدعفونی سطحی یکی از مراحل بسیار مهم در جلوگیری از شیوع آلودگی‌های باکتریایی و قارچی بر روی ریزنمونه‌ها، طی انجام مراحل کشت بافت است، به همین علت بهبود روش‌ها و تحقیق در مورد مواد جدید ضدعفونی در کشت‌های درون‌شیشه‌ای از اهمیت قابل ملاحظه برخوردار است(Khan et al., 2007). در کل موفقیت‌های پروتکل‌های کشت بافت گیاهی وابسته به ضدعفونی ریزنمونه است. هدف این تحقیق بررسی ترکیبات جدید جهت کنترل آلودگی‌های درونی و سطحی بود.

مواد و روش‌ها

ریزنمونه‌های برگی بدست آمده از قلمه‌های انگور دو رقم "خوشناو" و"فرخی" کشت شده در شاسی هوای آزاد به آزمایشگاه فیزیولوژی باغبانی منتقل شده و پس از نیم ساعت شستشو با آب شهری، با استفاده از هیپوکلرید سدیم و نانو ذرات نقره در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف مورد تیمار قرار گرفتند. سپس سه مرحله شستشوی با آب دوبار تقطیر اتوکلاو شده در زمان‌های ۱۰، ۱۵ و ۲۰ دقیقه انجام گردید و ریزنمونه‌های ضدعفونی شده در پتری‌دیش‌های استریل حاوی محیط کشت MS(موراشیگ و اسکوگ، ۱۹۶۸) کشت شدند. تیمارهای ضدعفونی شامل، تیمار شاهد(بدون ضدعفونی)(T1)، هیپوکلرید سدیم یک درصد، ۲۰ دقیقه – نانونقره با غلظت ۱ ppm به مدت یک دقیقه(T2)، هیپوکلرید سدیم یک درصد، ۲۰ دقیقه – نانونقره با غلظت ۱ ppm به مدت سه دقیقه(T3)، هیپوکلرید سدیم یک درصد، ۲۰ دقیقه – نانونقره با غلظت ۵ ppm به مدت یک دقیقه(T4)، هیپوکلرید سدیم یک درصد، ۲۰ دقیقه – نانونقره با غلظت ۵ ppm به مدت سه دقیقه(T5)، نانونقره با غلظت ۱۰ ppm به مدت یک دقیقه(T6) و نانونقره با غلظت ۱۰ ppm به مدت سه دقیقه(T7) بود. درصد ریزنمونه‌های غیر آلوده، آلوده و سوخته(قهوه‌ای یا اکسیده‌شده) به صورت مشاهده چشمی یادداشت گردید و بر اساس نتایج حاصل از تجزیه داده‌ها بازده و برتری تیمارها نسبت به یکدیگر و همچنین تفاوت دو رقم با یکدیگر مشخص گردید. برای تهیه هیپوکلرید سدیم از وایتکس های تجاری با پنج درصد کلر فعال استفاده گردید و نانوذرات نقره با غلظت ۴۰۰۰ پی‌پی‌ام از شرکت نانوسید خریداری گردید. داده برداری در یک بازه زمانی ده روزه انجام گرفت. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای آماری SAS و MSTAT مورد آنالیز قرار گرفت.

نتایج و بحث

نتایج حاصل نشان داد(جدول یک) میزان سوختگی ریزنمونه‌ها بسیار پایین بود. به طور کلی میزان تحمل بافت نسبت به نانو ذرات نقره بالا بود. سازگاری با بافت‌های گیاهی از نکات شاخص این ماده بود اما باید در نظر داشت که باقیمانده آن در محیط کشت می‌تواند برای ریزنمونه‌ها در ادامه ایجاد سمیت و سوختگی نماید. هیچ‌کدام از تیمارها نتوانستد آلودگی‌های قارچی را کنترل نمایند و تنها کنترل آلودگی‌های باکتریایی قابل ملاحظه بود. در تیمار شاهد در ابتدا تنها آلودگی‌های باکتریایی از خود نشان دادند و در چند روز ابتدایی تحقیق اثری از آلودگی قارچی در تیمار شاهد که فاقد ضدعفونی بود، مشاهده نشد. در ادامه آلودگی‌های قارچی نیز خود را نشان دادند. در مقایسه ریزنمونه‌های تحت تیمار، در ابتدا تنها آلودگی‌های قارچی نشان دادند و در بسیاری از ریزنمونه‌ها آلودگی باکتریایی دیده نشد. که این نشان دهنده توانایی بالای نانوذرات نقره در کنترل آلودگی‌های درونی باکتریایی است. در تیمارT5 کالوس از ریزنمونه‌های ضدعفونی شده توسط هیپوکلرید سدیم به همراه نانوذرات نقره بدست آمد(تصویر یک) که می‌توان آن را به باقیماندن آثار نانوذرات نقره بر روی ریزنمونه‌ها پس از شستشو توسط آب مقطر استریل نسبت داد. بعد از گذشت یک دوره سی روزه سوختگی ریزنمونه‌ها و تولید کالوس مشاهده گردید. با این حال به دلیل رشد عوامل آلوده‌کننده در محیط کشت، شرایط استریل مناسب ریزنمونه‌ها برای فرایند کشت بافت تامین نشد و تیمارهای ضدعفونی اعمال شده بی‌نتیجه ماند. با آنکه در برخی از تیمارها از لحاظ میزان ریزنمونه‌های آلوده و سالم بین دو رقم تفاوت‌هایی به چشم خورد اما از لحاظ آماری این تفاوت‌ها در سطح ۵٪ معنی‌دار نبود. عبدی و همکاران(۲۰۰۸) برای اولین بار تیمارهای نانوذرات نقره برای کنترل آلودگی‌های باکتریایی در شرایط درون شیشه‌ای گیاه سنبل‌الطیب (Valeriana officinalis L.) را به عنوان روشی جدید برای ضدعفونی سطحی ریزنمونه‌ها معرفی نمودند(Abdi et al., 2008). عبدی و همکاران(۲۰۰۸) گزارش نمودند که محلول نانوذرات

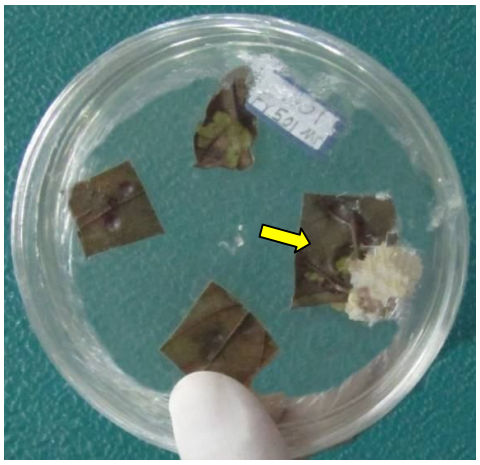
جدول ۱- اثر تیمارهای مختلف و درصد ریزنمونه‌های سالم، آلوده و سوخته دو رقم فرخی و خوشناو(٪)

تیمار	درصد ریزنمونه‌های سالم، آلوده و سوخته					
	سالم		آلوده		سوخته	
	فرخی	خوشناو	فرخی	خوشناو	فرخی	خوشناو
T1	۰±۰	۱/۲±۱۰	۰±۱۰۰	۱/۳±۹۰	۰±۰	۰±۰
T2	۰±۰	۰±۰	۰±۱۰۰	۰±۱۰۰	۰±۰	۰±۰
T3	۰±۰	۲/۱±۱۹	۰±۱۰۰	۳/۲±۸۲	۰±۰	۰±۰
T4	۰±۰	۰±۰	۰±۱۰۰	۰±۱۰۰	۰±۰	۰±۰
T5	۸/۱±۷۰	۰±۰	۱۲/۲±۳۴/۴	۰±۱۰۰	۰±۰	۰±۰
T6	۰±۰	۰±۰	۰±۱۰۰	۰±۱۰۰	۰±۰	۰±۰
T7	۱۰/۶±۳۴/۵	۰±۰	۹/۳±۶۷	۰±۱۰۰	۰±۰	۰±۰

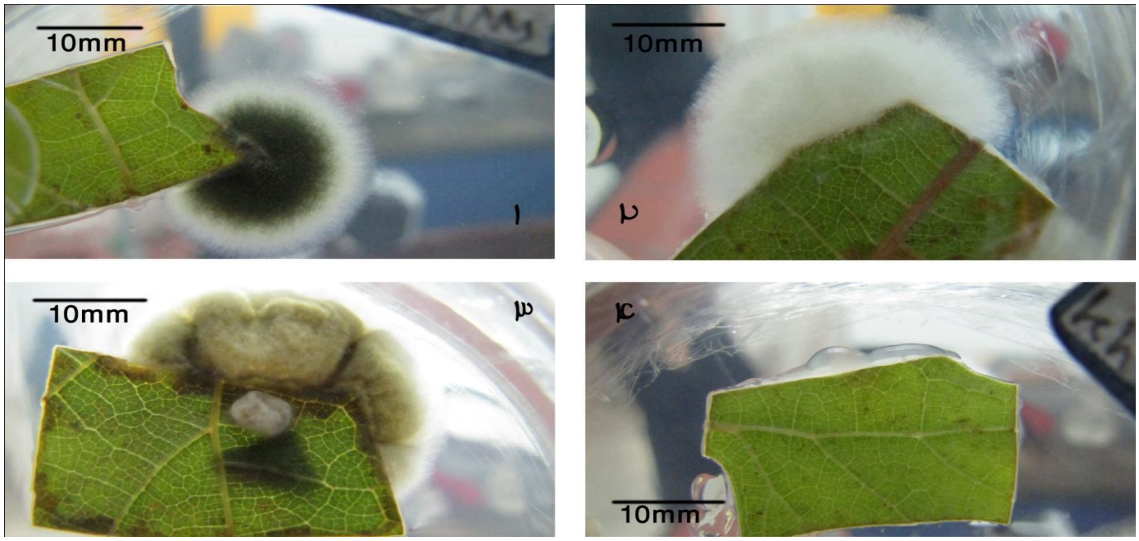
نقره پتانسیل خوبی برای کنترل آلودگی‌های درونی باکتریایی دارند. نتایج بدست آمده توسط بررسی ما نیز تائید کننده آن بود. در این کار به جز تیمارهای انجام گرفته هیچ گونه تیمار ضدعفونی سطحی دیگری انجام نگرفت تا توان نانوذرات نقره برای ضدعفونی بیشتر مشخص شود. علت میزان بالای آلودگی به خصوص آلودگی‌های قارچی(تصویر دو) را می توان به این امر و همچنین به توانایی پایین نانوذرات نقره برای کنترل آلودگی‌های قارچی نسبت داد. این مطلب با نتایج کیم و همکاران(۲۰۱۲) در مورد اثر ضدقارچی نانوذرات نقره بر قارچ‌های بیمارزای مختلف گیاهی(Kim et al., 2012) همخوانی نداشت، البته به دلیل نامشخص بودن جنس قارچ‌های رشد کرده در پتری دیش‌ها، مقایسه‌ای با قارچ‌های گزارش شده توسط آنها انجام نشد. یکی از دلایل تفاوت نتایج در این دو تحقیق را می‌توان این امر دانست که آنها از نانو ذرات نقره برای ضدعفونی سطحی در کشت بافت گیاهی ریزنمونه‌ها استفاده نکرده بودند. نانو نقره تاثیر دیرهنگام‌تر ولی طولانی مدت‌تر نسبت به مواد ضدعفونی‌کننده‌ای مانند هیپوکلرید سدیم دارد. بنابراین حضور نانوذرات نقره در داخل محیط کشت(بررسی کیم و همکاران) می‌تواند تاثیر بهتری داشته باشد و کنترل شدیدتری را اعمال نماید. ما در این بررسی پس از ضدعفونی توسط تیمارهای نانوذرات نقره اقدام به شستشوی ریزنمونه‌ها توسط آب مقطر اتوکلاو شده در زیر هود می‌کردیم که از ورود مواد ضدعفونی کننده به محیط کشت و تغییر ترکیب محیط کشت و تاثیر بر سایر مواد موجود مانند تنظیم‌کننده‌های رشد و عناصر غذایی و ویتامین‌ها در محیط کشت جلوگیری نمایم

جدول ۲- نتیجه عملکرد تیمار های بعد از ده روز و دسته بندی آماری (-) فاقد یا بسیار ضعیف، (+) ضعیف، (++) متوسط، (+++) شدید، (++++) بسیار شدید

تیمار	سالم		آلوده		سوخته	
	فرخی	خوشناو	فرخی	خوشناو	فرخی	خوشناو
T1	c–	c–	a++++	a++++	c–	c–
T2	c–	c–	a++++	a++++	c–	c–
T3	c–	c–	a++++	a++++	c–	c–
T4	c–	c–	a++++	a++++	c–	c–
T5	ab+++	c–	a++++	bc++	c–	c–
T6	c–	c–	a++++	a++++	c–	c–
T7	bc++	c–	a++++	ba+++	c–	c–



تصویر ۱- کالوس حاصل از ریزنمونه‌های ضدعفونی شده توسط نانوذرات نقره و سوختگی ریزنمونه‌ها بعد از گذشت سی روز



تصویر ۲ – الف.آلودگی‌های قارچی رشد کرده در سطح ریزنمونه‌های، شکل‌های ۱، ۲ و ۳ ب. آلودگی باکتریایی رشد کرده در سطح ریزنمونه در تیمار شاهد، شکل ۴

بنابراین نتایج ما تا حدودی می‌توان موئد این مطلب باشد که نانوذرات نقره قدرت ضدمیکروبی خود را بیشتر با ایجاد یک پوشش در سطح اعمال می‌نمایند و در صورت حذف شدن از محیط دیگر تاثیر خود را نخواهند داشت(جدول ۲).با توجه به اینکه در رابطه با استفاده از نانوذرات نقره برای ضدعفونی مواد درون شیشه‌ای تحقیقات بسیار کمی انجام شده است، در این بررسی سعی شد تا اثر نانوذرات نقره به عنوان یک ماده ضدعفونی کننده سطحی در گیاه انگور بررسی شود که نتایج نشان داد نانو ذرات نقره در زمان‌های یک و سه دقیقه با غلظت‌های یک تا ده پی‌پی‌ام به طور کلی دارای پتانسیل ضعیف تا متوسط برای کنترل آلودگی‌های مختلف است اما توانایی کنترل آلودگی‌های باکتریایی را در حد خوب داراست که این نتیجه با گزارش چامبرز و همکاران(۱۹۶۲) در مورد اثرات ضدباکتریایی نقره موافق است.

منابع

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

Buckley, P.M., DeWilde, T.N., Reed, B.M., 1995 Characterization and identification of bacteria isolated from micropropagated mint plants. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant 31, 58-64.

Chamakura, K., Perez-Ballestero, R., Luo, Z., Bashir, S., Liu, J., 2011. Comparison of bactericidal activities of silver nanoparticles with common chemical disinfectants. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 84, 88-96.

Chambers, C.W., Proctor, C.M., Kabler, P.W., 1962. Bactericidal effect of low concentrations of silver. Journal (American Water Works Association) 54, 208-216.

Çolgecen, H., KOCA, U., TOKER, G., 2011. Influence of different sterilization methods on callus initiation and production of pigmented callus in Arnebia densiflora Ledeb. Turk J Biol 35, 513-520.

Fraise, A., Maillard, J.-Y., Sattar, S., 2012. Russell, Hugo and Ayliffe's Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization. Wiley-Blackwell.

Khan, S., Rashid, H., Chaudhary, M., Chaudhry, Z., 2007. Optimization of explant sterilization condition in sugarcane cultivars. Pakistan Journal of Agricultural Research 20, 119-123.

Leifert, C., Waites, W., Nicholas, J., 1989. Bacterial contaminants of micropropagated plant cultures. Journal of Applied Microbiology 67, 353-361.

Oldenburg, S.J., 2011. Silver Nanoparticles: Properties and Applications.

Rajabi, O., Fazly Bazzaz, B.S., Vaseghi, A.R., Salari, R., 2011. Standardizing the Bactericidal Activities of Silver Nanoparticles Made By Electrochemical Reduction and Comparing It with Deconex 53 Instrument. Iranian Journal of Pharmaceutical Research 10, 481-487.

Reed ,B.M., Tanprasert, P., 1995. Detection and control of bacterial contaminants of plant tissue cultures. A review of recent literature. Plant tissue culture and Biotechnology 1, 137-142.

Sondi, I., Salopek-Sondi, B., 2004. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E.coli as a model for Gram-negative bacteria. Journal of colloid and interface science 275, 177-182.