مجله علوم گیاهان زراعی ایران
دوره ۴۲، شماره ۳، ۱۳۹۰ (۴۵۲-۴۴۵)

کاربرد نانو ذرات نقره در کنترل آلودگی میکربی و بازیابی گیاهچه‌های دابلد هاپلویید چغندر قند در شرایط این ویترو

فرانک روزبه[1]*، داریوش داودی[2] و اسلام مجیدی[3]
۱، استادیار مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند، کرج
۲، ۳، استادیار و استاد پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج
(تاریخ دریافت: ۸۸/۴/۱۵ - تاریخ تصویب: ۸۹/۱۰/۲۹)

چکیده

در این تحقیق امکان بازیابی گیاهچه‌های دابلد هاپلویید آلوده و رو به اضمحلال حاصل از کشت تخمک با استفاده از نانوذرات نقره در کشت بافت گیاهی مورد ارزیابی قرار گرفت. مقادیر متفاوت نانونقره (صفر، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، و ۱۲۵ پی‌پی‌ام) در محیط کشت جامد MS استفاده شد و گیاهچه‌های دابلد هاپلویید آلوده با تیمار شستشوی اولیه و بدون انجام شستشو با محلول نانونقره، در تیمارهای مختلف واکشت گردیدند. از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تکرار استفاده شد و پس از ۳۰ روز تعداد گیاهچه‌های بازیابی شده مورد تجزیه تحلیل آماری قرار گرفت. نتایج نشان داد که هر دو فاکتور پیش شستشو و کاربرد نانونقره اثر معنی‌داری بر کنترل آلودگی دارند. رفتار نانوذرات نقره در محیط کشت مایع و جامد متفاوت بوده و علاوه بر اثر ضدمیکربی آن تحت تأثیر ترکیب محیط کشت قرار گرفت. ضمن اینکه باکتری‌ها حتی در غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۲۵ پی‌پی‌ام نانونقره حذف نشدند اما از رشد و تکثیر آنها جلوگیری شد. به موازات افزایش غلظت نانونقره، یک افزایش خطی در نرخ بازیابی گیاهچه‌های دابلد هاپلویید آلوده مشاهده گردید. روند پوسیدگی گیاهچه‌ها در غلظت ۱۲۵ پی‌پی‌ام نانوذرات نقره متوقف شده و بازیابی سبزینگی و تکثیر گیاهچه‌ها در شرایط این ویترو با نرخ صددرصد اتفاق افتاد. چنین به نظر می‌رسد که تأثیر نانوذرات نقره صرفاً به علت خاصیت ضد میکربی نبوده و احتمال می‌رود در فرایندهای بیوشیمیایی و خصوصیات محیط کشت دخالت داشته باشد که نیاز به مطالعه و تحقیق بیشتر دارد.

واژه‌های کلیدی: نانونقره، چغندرقند، آلودگی درون شیشه‌ای، کشت بافت.

مقدمه

طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها و میکروآرتروپودها به عنوان آلوده‌کنندگان کشت بافت‌های گیاهی شناخته شده‌اند. علیرغم تمام تدابیری که در آزمایشگاه‌های کشت بافت برای جلوگیری از آلودگی کشت‌ها اتخاذ می‌شود آلودگی‌های باکتریائی هنوز به عنوان یک معضل در روش‌های کشت درون‌شیشه‌ای است (Enlarjic et al., 1988; Leifert & Casselles, 2001; Odutayo et al., 2004, 2007). قارچ‌ها و باکتری‌ها از جمله مهم‌ترین میکروارگانیسم‌های آلوده‌کننده در کشت بافت گیاهی می‌باشند (Leifert & Casselles, 2001). پی‌آمدهای وجود آلودگی در کشت بافت شامل افزایش هزینه، اثرات مضر بر کشت‌ها، نتایج آزمایشی غلط، و از دست دادن مواد با ارزش می‌باشد که این مورد آخر در تولید

* نویسنده مسئول: فرانک روزبه تلفن: ۰۲۶۱-۲۷۰۲۶۱۳ E-mail: fardalia@yahoo.com

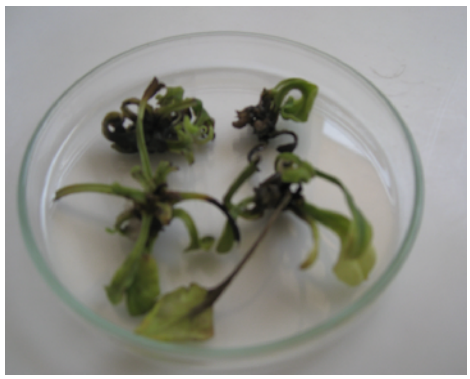
گیاهچه‌های دابلد هاپلویید بیشتر مصداق می‌یابد. آلودگی در کشت بافت را نمی‌توان به صورت کامل حذف نمود بلکه می‌توان برای کاهش فراوانی و شدت پی‌آمدها، آن را مدیریت نمود (Ryan, 2008). آنتی‌بیوتیک‌ها و قارچ‌کش‌هایی که گاهی برای مقابله با آلودگی‌های قارچی و باکتریایی در کشت بافت استفاده می‌شوند همیشه مؤثر نیستند و از طرف دیگر دارای اثرات مضری بر رشد گیاه، افزایش هزینه و ایجاد نژادهای مقاوم میکروبی هستند (Neidz Randall, 1997; CuiRong et al., 2004). انواع راهکارهای شیمیایی و غیرشیمیایی برای جلوگیری و کنترل آلودگی‌های میکروبی در کشت بافت گیاهی به کار گرفته شده‌اند (Reed & Tanprasert 1995)، اما این مشکل هنوز هم به عنوان یک معضل در کشت بافت گیاهی مطرح می‌باشد. نقره از جمله ترکیباتی است که خواص ضدمیکروبی آن سال‌های متمادی است که شناخته شده و به شکل‌های گوناگون از جمله در کشت بافت گیاهی مورد استفاده قرار گرفته است. نانوذرات نقره به علت داشتن سطح ویژه بالا و فراکشن زیاد اتم‌های سطحی نسبت به نقره دارای خواص آنتی‌میکربی بیشتر بوده و بر همین اساس در سال‌های اخیر به موازات رشد و توسعه نانوتکنولوژی، کاربرد نانوذرات نقره در محصولات بهداشتی و در مبارزه بر علیه میکروب‌ها هم گسترش یافته است (Zeng et al., 2007; Kim et al., 2007; Kim et al., 2008; Abdi et al., 2008). کشت بافت چغندرقند نیز از مسئله آلودگی مبری نبوده و در بعضی شرایط عوامل آلوده کننده به صورت کاملاً خسارت‌زا ظاهر می‌گردند (Roozbeh, 2004; Yavari, 2007). تجربه چندین ساله کشت بافت در آزمایشگاه مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند نشان داده است که باکتری Erwinia یکی از مهم‌ترین آنها می‌باشد. خسارت Erwinia به علت هیدرولیز کردن پکتین بین سلولی و تجزیه دیواره سلولی معمولاً به شکل پوسیدگی ظاهر می‌شود که همراه با سیاه شدن بافت، شکل غالب خسارت آن در کشت بافت چغندرقند و شرایط این ویترو می‌باشد (گزارش منتشر نشده). تولید لاین‌های دابلد هاپلویید در چغندرقند معمولاً با کشت تخمک صورت می‌گیرد که صرف نظر از کارآیی پایین در باززایی (Bossoutrot & Smith, 1990; Hosemans, 1985; Galatowitsch & Van Gevt et al., 1987)، ضعف عمومی گیاهچه‌های دابلد هاپلویید بخصوص در مقابل عوامل بیماریزا باعث می‌شود که کاربرد این تکنیک در چغندر قند با مشکلات عدیده‌ای همراه شود. با توجه به مقاومت بالای Erwinia نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها و خسارت گسترده آن به گیاهچه‌های چغندرقند در شرایط این‌ویترو (Roozbeh, 2004)، در این تحقیق امکان جلوگیری از رشد و یا حذف آلودگی‌های باکتریایی در گیاهچه‌های دابلد هاپلویید چغندرقند با استفاده از نانوذرات نقره مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نانونقره: کلوئید نانونقره با غلظت اولیه ۴۰۰۰ پی‌پی‌ام (نانوسید) مورد استفاده قرار گرفت. با توجه به تأثیر اندازه نانوذرات در رفتار آنها، اندازه نانوذرات با استفاده از میکروسکوپ پروبی روبشی AC-AFM مورد بررسی قرار گرفت.

مواد گیاهی: مواد گیاهی مورد استفاده، گیاهچه‌های دابلد هاپلویید حاصل از کشت تخمک چغندرقند بود که دارای آلودگی باکتریایی بودند (شکل ۱). نوع آلودگی گیاهچه‌ها در آزمایشگاه مشخص گردید به این ترتیب که با ظاهر شدن هاله آلودگی در اطراف گیاهچه‌ها از قسمت‌های آلوده نمونه‌برداری و در محیط کشت NBY (Nutrient Broth: 8 g، K_2HPO_4: 1g، Yeast Extract: 1g ، KH_2PO_4:0.25g، Glucose: 2g، MgSO4 (1M): 1 ml و Agar: 18g) قرار داده شد. کشت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸°C انکوبه شدند. با کشت مجدد این جدایه‌ها در محیط کشت NBY نسبت به خالص سازی آنها اقدام گردید. جدایه‌های مذکور در محیط کشت LB به مدت ۲۴ ساعت و دردمای ۲۸°C و ۱۸۰ rpm انکوبه شدند. به منظور بررسی تاثیر ذرات نانونقره در بازدارندگی جدایه‌های باکتریایی مذکور ظرف‌های حاوی محیط کشت NBY تهیه و به هر کدام ۱۰۰µ l از کشت ۲۴ ساعته باکتری اضافه شد. سپس غلظت‌های متفاوت نانونقره اضافه شده و با سوسپانسیون باکتریایی موجود روی سطح پتری مخلوط و سپس به وسیله یک لوپ در سطح آن پخش شد. این آزمایش با استفاده از محیط

کشت LB در دمای ۲۸ °C و ۱۸۰ rpm نیز صورت گرفت و میزان بازدارندگی رشد جدایه‌ها توسط ذرات نانونقره ۷۲ ساعت بعد بررسی شد. بر اساس نتایج تعیین غلظت مؤثر از نانو ذرات نقره در کشت میکربی مایع و جامد, غلظت‌های متفاوت نانونقره (صفر، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، و ۱۲۵ پی‌پی‌ام) در محیط کشت جامد MS استفاده شد و گیاهچه‌های دابلد هاپلویید آلوده به دو روش روی آنها واکشت گردیدند. در روش اول، گیاهچه‌های آلوده قبل از واکشت، به مدت ۲۰ دقیقه در محلول نانونقره قرار داده شدند و در روش دوم بدون شستشو با محلول نانونقره واکشت انجام شد. به این ترتیب آزمایش فاکتوریل با دو فاکتور غلظت نانونقره (پنج سطح) و شستشو (دو سطح) در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تکرار و در هر تکرار ۴ گیاهچه در نظر گرفته شد. اضافه کردن نانونقره به محیط کشت MS پس از اتوکلاو و رسیدن به دمای ۵۰-۴۰ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. در هر ظرف، چهار گیاهچه آلوده کشت شده و در فیتوترون با دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد و فتوپریود ۱۶ ساعت نوری قرار داده شدند. تعداد نمونه‌هایی که پس از ۳۰ روز بازیابی شده و تعداد گیاهچه‌های سبز جدید و بدون لکه سیاه به عنوان شاخص تأثیر نانو ذرات نقره در کنترل آلودگی مورد شمارش قرار گرفت و داده‌های مربوطه با نرم افزار SPSS مورد تجزیه تحلیل آماری قرار گرفتند.



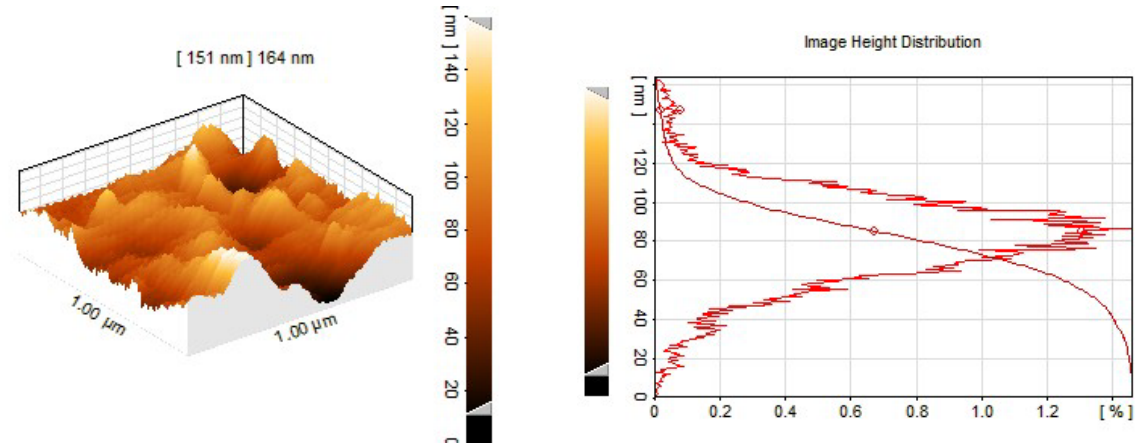
شکل ۱- گیاهچه‌های آلوده چغندرقند در شرایط این‌ویترو. کلاسترهای آلوده با ظاهری ضعیف، دارای برگ‌های سبز مایل به زرد بودند که هیچگونه رشد و تکثیری نداشتند. با پیشرفت آلودگی، قهوه‌ای شدن بخش میانی گیاهچه از منطقه مریستم انتهایی و یا قاعده برگ‌های اطراف شروع شده و به پهنک برگ پیشروی کرده و در نهایت سیاه و پوسیده شده و از بین رفتند.

ریشه‌زایی شاخه‌های بازیابی شده

تعداد شاخه‌های بازیابی شده و سالم قبل از ریشه‌زایی با چندین سیکل تکثیر در شرایط این‌ویترو افزایش داده شدند. برای ریشه‌دار شدن شاخه‌های جدید و بازیابی شده، محیط کشت پایه و ویتامین‌های MS همراه با ۳ میلی‌گرم در لیتر NAA استفاده شد و کشت‌ها در شرایط محیطی با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی قرار داده شدند. شاخه‌های ریشه‌دار شده پس از ۳ هفته به گلدان‌های حاوی نسبت ۱:۱ از پیت ماوس و خاک مزرعه منتقل شدند. این گلدان‌ها در ظروف پلاستیکی شفاف جهت حفظ رطوبت بالا و طی دوره سازگاری در فیتوترون قرار داده شدند. گیاهچه‌های سازگار شده در نهایت به گلدان‌های یک کیلویی حاوی نسبت ۳:۱ از پیت ماوس:خاک مزرعه منتقل شده و در گلخانه قرار داده شده و سپس به مزرعه منتقل شدند.

نتایج و بحث

اندازه نانوذرات نقره بر اساس تصاویر میکروسکوپ پروب روبشی و منحنی توزیع ارتفاع (شکل۲) متغیر بوده به طوری که با توجه به منحنی توزیع، اندازه قسمت اعظم ذرات کمتر از ۱۰۰ نانومتر بوده و این در حالی است که سطح روبش شده حاصل توده نانوذرات می‌باشد و طبیعتاً در صورت تهیه سطح دارای ذرات منفرد، اندازه‌ها به مقیاس گزارش شده برای فرآورده (حدود ۵ نانومتر) نزدیک‌تر می‌شود. برای نانوذرات نقره نیز مثل سایر نانوذرات، گزارش‌هایی در مورد خصوصیات وابسته به اندازه و شکل ذرات وجود دارد. Elechiguerra et al. (2005) گزارش کردند که اثر متقابل نانوذرات نقره با ویروس عامل نقص سیستم ایمنی انسان تحت تأثیر اندازه ذرات قرار می‌گیرد. مشابه این گزارش برای اثر متقابل اندازه نانوذرات نقره با باکتری‌های گرم منفی گزارش شده است (Morones et al., 2005; Pal et al., 2007). بنابراین در بررسی رفتار نانوذرات و بخصوص در مطالعات مقایسه‌ای بایستی این نکته مورد توجه قرار گیرد که نانوذرات دارای اندازه‌ها و اشکال‌مختلف، رفتارها و خصوصیات متفاوتی می‌توانند داشته باشند. محیط کشت‌های جامدی که در این تحقیق نانوذرات نقره به آنها اضافه شده بود به مرور زمان دچار تغییر رنگ شده که احتمالاً ناشی از اکسیداسیون نانوذرات می‌باشد.

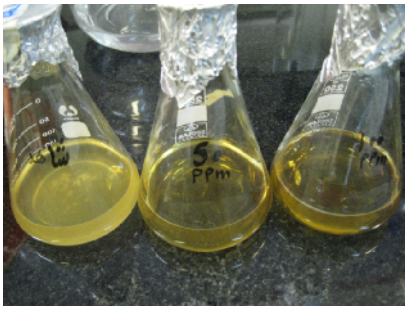
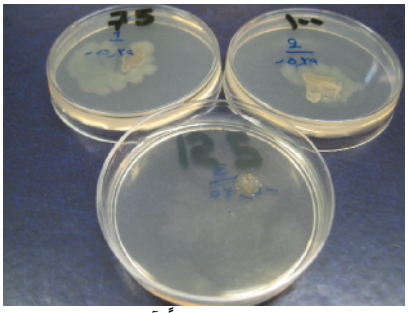


شکل ۲- دیاگرام سه بعدی بالک ذرات نانونقره حاصل از روبش با تکنیک AC-AFM (سمت چپ)، و منحنی توزیع اندازه (سمت راست). (تهیه عکس: آزمایشگاه شرکت مهارفن ابزار)

باکتری گرم منفی Erwinia به عنوان باکتری عامل پوسیدگی گیاهچه‌ها در آزمایشگاه گیاهپزشکی تشخیص داده شد. همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود غلظت ۵۰ پی‌پی‌ام نانونقره در محیط کشت مایع LB در مقایسه با شاهد، بخوبی از رشد و تکثیر این باکتری جلوگیری به عمل آورده است اما در محیط کشت جامد، غلظت‌های بالای ۱۰۰ پی‌پی‌ام آن نیز علیرغم کاهش سرعت رشد و تکثیر، در مقایسه با محیط کشت مایع بازدارنده نبودند. شاید بتوان عدم توزیع یکنواخت ذرات در محیط کشت جامد را از جمله عوامل احتمالی رفتار متفاوت آنها در محیط کشت‌های جامد و مایع دانست.

جدول‌های ۱ و ۲ نتایج تجزیه واریانس گیاهچه‌های بازیابی شده و گیاهچه‌های جدید تحت تیمارهای مختلف نانونقره را نشان می‌دهند. استفاده از نانونقره در محیط کشت و کاربرد آن برای شستشوی قبل از واکشت مؤثر بوده و به طور کاملاً معنی داری موجب بازیابی گیاهچه‌های آلوده و ایجاد شاخ و برگ جدید شده است. برخلاف برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها مثل تتراسایکلین، سولفونامیدها، کلرامفنیکل و برخی دیگر که در غلظت پایین، خاصیت باکتریواستاتیک و در غلظت بالا خاصیت باکتریوسید نشان می‌دهند (Lee et al., 2006)، نانونقره در همه غلظت‌های به کار رفته به عنوان یک ترکیب باکتریواستاتیک عمل کرد به این صورت که با تلقیح محیط کشت باکتریایی توسط گیاهچه‌هایی که به مدت یک ماه روی محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف آن بود دوباره رشد و تکثیر باکتری اتفاق افتاد که نشان می‌دهد باکتری‌ها از بین نرفته‌اند و در هیچکدام از تیمارهای نانونقره، خاصیت باکتریوسید مشاهده نشد (شکل ۳). نتایج مربوط به شستشوی نمونه‌های آلوده به مدت ۲۰ دقیقه قبل از واکشت روی محیط کشت حاوی نانونقره (شکل ۴) نشان داد که در صورتی که غلظت نانونقره در محیط کشت پایین باشد، شستشو نیز نمی‌تواند بازیابی گیاهچه‌های آلوده و ایجاد شاخ و برگ جدید را بهبود بخشد. در صورتی که غلظت مناسب تیمار نانونقره برای محیط کشت در نظر گرفته شود شستشو می‌تواند به نحو مؤثر و معنی‌داری در بازیابی گیاهچه‌های آلوده نقش داشته باشد. از طرف دیگر بازیابی گیاهچه پیش شرط ایجاد شاخه جدید می‌باشد به این معنی که تیمارهای مؤثر بر آن لزوماً بر صفت ایجاد شاخه جدید نیز مؤثر خواهند بود. لذا کاهش سطح اطمینان اثر اصلی تیمار پیش شستشو و معنی‌دار نشدن اثر متقابل آن با غلظت نانونقره در صفت ایجاد شاخه جدید (جدول ۲)، نشان‌دهنده کم اهمیت بودن آن نیست بلکه چون در صفت بازیابی به طور معنی‌داری سهیم بوده و اثر افزایشی داشته است استفاده از آن توصیه می‌گردد.

علیرغم تیمارهای شدید آنتی‌بیوتیکی بر علیه این نوع آلودگی در کشت بافت چغندرقند و مهار نشدن آن، استفاده از نانونقره در غلظت مناسب توانست از رشد و گسترش باکتری Erwinia در آزمایشگاه و کشت‌ها

شکل ۳- (راست) تلقیح مواد گیاهی که قبلاً آلودگی داشته و مدتی روی نانوذره واکشت شده روی محیط کشت باکتریایی. رشد و تکثیر باکتری در این شرایط نشان‌دهنده عدم حذف آنها در حضور نانونقره بوده است. (چپ) تلقیح سویه جدا شده در محیط کشت مایع LB حاوی غلظت‌های متفاوت نانونقره. رشد و تکثیر باکتری پس از ۷۲ ساعت در تیمار شاهد (ارلن سمت چپ) اتفاق افتاد اما غلظت‌های ۵۰ پی‌پی‌ام و بالاتر مانع رشد و تکثیر آن شدند (ارلن وسط با ۵۰ پی‌پی‌ام و سمت راست با ۱۰۰ پی‌پی‌ام).

جدول ۱- تجزیه واریانس صفت گیاهچه‌های بازیابی شده چغندرقند تحت تیمارهای غلظت نانونقره و پیش شستشو

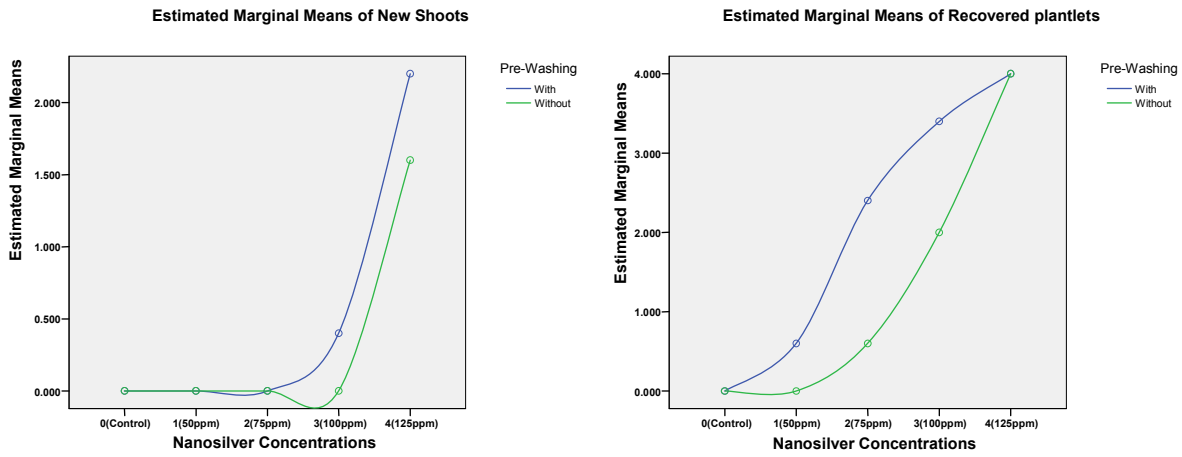
منابع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F
غلظت نانونقره	۱۱۱/۸۰۰	۴	۲۷/۹۵۰	۱۶۴/۴۱۲**
پیش شستشو	۷/۲۲۰	۱	۷/۲۲۰	۴۲/۴۷۱**
غلظت نانونقره × پیش شستشو	۶/۶۸۰	۴	۱/۶۷۰	۹/۸۲۴**
خطا	۶/۸۰۰	۴۰	۰/۱۷۰	
کل	۱۳۲/۵۰۰	۴۹		

* و ** : به ترتیب معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد، ns: عدم اختلاف معنی‌دار.

جدول ۲- تجزیه واریانس صفت ایجاد شاخه های جدید ایجاد شده تحت تیمارهای غلظت نانونقره و پیش شستشو

منابع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F
غلظت نانونقره	۲۷/۶۸۰	۴	۶/۹۲۰	۸۶/۵۰۰**
پیش شستشو	۰/۵۰۰	۱	۰/۵۰۰	۶/۲۵۰*
غلظت نانونقره × پیش شستشو	۰/۸۰۰	۴	۰/۲۰۰	۲/۵۰۰ns
خطا	۳/۲۰۰	۴۰	۰/۰۸۰	
کل	۳۲/۱۸۰	۴۹		

* و **: به ترتیب معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد، ns: عدم اختلاف معنی‌دار.

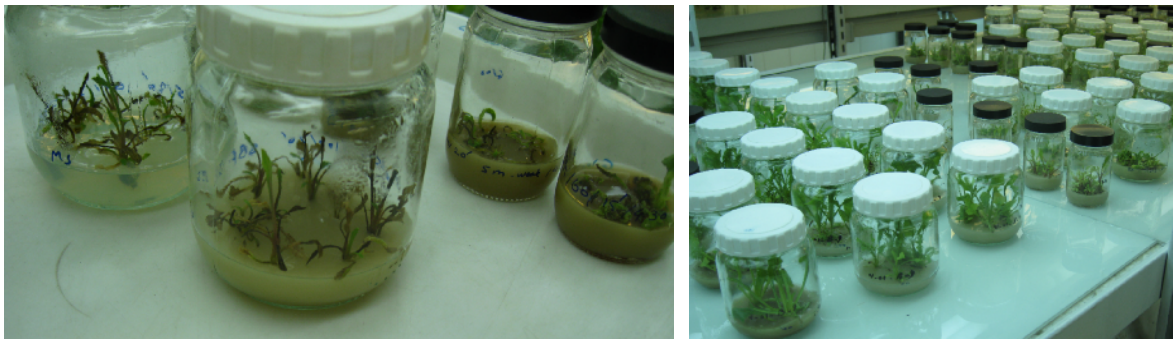


شکل ۴- تأثیر افزایش غلظت نانونقره و تیمار پیش‌شستشو بر روند بازیابی گیاهچه‌های آلوده (منحنی سمت راست) و ایجاد شاخه جدید (منحنی سمت چپ). حالت جبران‌کنندگی تیمار پیش شستشو در غلظت‌های پایین نانونقره در هر دو منحنی (خط آبی) بارز می‌باشد.

جلوگیری کند. Alt et al. (2003) نیز خواص ضد میکربی یکی از فرآورده‌های نانونقره را در مقایسه با چند نوع آنتی‌بیوتیک در شرایط این ویترو انجام دادند و فرآورده نانوسیلور را تنها تیمار مؤثر بر علیه همه نژادهای مقاوم باکتری مورد مطالعه اعلام نمودند.

Petica et al. (2008) با ارزیابی خاصیت ضدمیکربی نانوسیلور در شرایط این ویترو به این نتیجه رسیدند که حداقل غلظت مؤثر نانوسیلور برای از بین بردن باکتری‌ها تقریباً دو برابر غلظت آن برای بازدارندگی می‌باشد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که در شرایط به کارگیری نانونقره در این تحقیق، اگر هدف از بین بردن باکتری باشد غلظت آن بایستی بیش از ۱۲۵ پی‌پی‌ام در نظر گرفته شود.

نتایج این تحقیق نشان داد که رفتار نانوذرات نقره در محیط کشت مایع و جامد متفاوت بوده و علاوه بر این، اثر ضدمیکربی آن تحت تأثیر فرمولاسیون محیط کشت قرار می‌گیرد. Lok et al. (2007) نیز با مطالعه ارتباط بین خواص ضدمیکربی نانونقره با اندازه ذرات آن به این نتیجه رسیدند که نانوذرات نقره در محیط کشت‌های با میزان الکترولیت بالا تشکیل توده داده و خواص آنتی‌میکربی آنها کاهش می‌یابد. محیط کشت پایه MS که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت، تقریباً دارای بالاترین میزان الکترولیت در بین محیط کشت‌های گیاهی می‌باشد و بالطبع کاهش خواص ضدمیکربی نانوذرات نقره در آن دور از انتظار نیست. از طرف دیگر باکتری‌ها حتی در غلظت‌های زیاد نانونقره حذف نشدند اما از رشد و تکثیر آنها جلوگیری شد. روند پوسیدگی گیاهچه‌ها در غلظت ۱۲۵ پی‌پی‌ام نانوذرات نقره متوقف شده و بازیابی سبزینگی و تکثیر گیاهچه‌ها در شرایط این‌ویترو با نرخ صددرصد رخ داد (شکل ۵).



شکل ۵- وضعیت عمومی گیاهچه‌های آلوده قبل از اعمال تیمار (سمت چپ)، و وضعیت عمومی گیاهچه‌های دابلد هاپلویید پس از اعمال تیمار و روی محیط کشت حاوی نانوذرات نقره (سمت راست).

چنین به نظر می‌رسد که تأثیر نانوذرات نقره صرفاً به علت خاصیت ضدمیکربی نبوده و احتمال می‌رود در خصوصیات محیط کشت و فرایندهای بیوشیمیایی دخالت داشته باشد که نیاز به مطالعه و تحقیق بیشتر دارد. از این نوع اثرات جانبی نانوذرات نقره در کشت درون‌شیشه‌ای گل محمدی نیز قبلاً گزارش شده است (Salimi & Alizadeh, 2009). آنها احتمال اثر نانونقره بر اتیلن را عامل رشد بهتر و شاداب بودن گیاهان تیمار شده با نانونقره در مقایسه با گیاهان شاهد مطرح کردند. نتایج بررسی Abdi et al. (2008) مربوط به مؤثر بودن استفاده از نانونقره در مرحله ضدعفونی سطحی اولیه و نتایج این تحقیق در مورد اینکه نانونقره نه تنها برای ضدعفونی سطحی بلکه برای کنترل آلودگی و نجات نمونه‌های آلوده نیز می‌تواند در کشت بافت گیاهی به کار گرفته شود، نشان می‌دهند که می‌توان از نانونقره به عنوان یک جایگزین مناسب و مؤثرتر برای آنتی‌بیوتیک‌ها در شرایط این‌ویترو استفاده نمود.

ریشه‌زایی و سازگاری گیاهچه‌ها: با توجه به اینکه تیمار ۱۲۵ پی‌پی‌ام نانونقره بخوبی باعث کنترل آلودگی شده بود، لذا این تیمار برای کلیه شاخه‌های آلوده مورد استفاده قرار گرفت و پس از سالم سازی نیز با چند سیکل تکثیر، ازدیاد گردیدند. درصد بسیار بالای ریشه‌زایی (بالاتر از ۹۵٪) برای تعداد ۱۸۰ شاخه سالم سازی و تکثیر شده اتفاق افتاد و همان طور که قبلاً نیز

ذکر شد، به نظر می‌رسد که تأثیر نانونقره در شرایط این ویترو صرفاً آنتی‌بیوتیکی نبوده و ارتقاء کیفی گیاهچه‌ها چه در مرحله تکثیر و چه در مرحله ریشه‌زایی، بواسطه خصوصیات و رفتار جدیدی است که این نانوذرات در اثر متقابل با شرایط مختلف از خود نشان می‌دهند و هنوز هم کاملاً شناخته شده نیست. گیاهچه‌های ریشه‌دار شده نیز بخوبی سازگار شده و پس از انتقال به گلدان‌های یک کیلویی به گلخانه (شکل ۶) و سپس به مزرعه انتقال داده شدند.

شکل ۶- گیاهچه‌های سالم پس از ریشه‌زایی و طی دوره سازگاری در فیتوترون به گلخانه منتقل شده و آماده استقرار در مزرعه هستند.

REFERENCES

1. 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(5), 709-714.
2. Alt, V., Bechert, T., Steinrücke, P., Wagener, M., Seidel, P., Dingeldein, E., Domann, E. & Schnettler, R. (2004). An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement. *Biomaterials*, 25(18), 4383-91.
3. Bossoutrot, D. & Hosemans, D. (1985). Gynogenesis in *Beta vulgaris* L. From in vitro culture of unpollinated ovules to production of doubled haploid plants in soil. *Plant Cell Report*, 4, 300-303.
4. CuiRong, Y., FuNing, O., XueQin, G. & RongShuang, L. (2004). Control of bacterial contaminants in tissue culture of *Rosa hybrida* cv. Mini. *Plant Physiology Communications*, 40, 45-47.
5. Elechiguerra, J. L., Burt, J. L., Morones, J. R., Bragado, A. C., Gao, X., Lara, H. H. & Yacaman, M. J. (2005). Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *Journal of Nanobiotechnology*, 3, 6.
6. Enjalric, F., Carron, M. P. & Lardet, L. (1988). Contamination of primary cultures in tropical areas: The Case of *Hevea brasiliensis*. *Acta Horticulturae*, 225.
7. Galatowitsch, M. W. & Smith, G. A. (1990). Regeneration from unfertilized ovule callus of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Can J Plant Sci*, 70, 83-89.
8. 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.
9. Kim, H., Kang, H., Chu, G. & Byun, H. (2008). Antifungal effectiveness of nanosilver colloid against rose powdery mildew in greenhouses. *Solid State Phenomena*, 135, 15-18.
10. Knauss, J. F. & Miller, J. W. (1978). A contaminant, Erwinia cartovora, affecting commercial plant tissue cultures. *In Vitro Cellular and Development Biology-Plant*, 14(9), 754-756.
11. Lee, J. Y., Oh, W. S., Ko, K. S., Heo, S. T., Moon, C. S., Ki, H. K., Kiem, S., Peck, K. R. & Song, J. H. (2006). Synergy of arbekacin-based combinations against vancomycin hetero-intermediate *Staphylococcus aureus*. *J Korean Med Sci*, 21, 188-92.
12. Leifert, C. & Casselles, A. C. (2001). Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. *In Vitro Cellular and Development Biology-Plant*, 37(2), 133-139.
13. Lok, C. N., Ho, C. M., Chen, R., He, Q. Y., Yu, W. Y., Sun, H., Tam, P. K. H., Chiu, J. F. & Che, C. M. (2007). Silver nanoparticles: Partial oxidation and antibacterial activities. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 12 (4), 527-534.
14. Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramirez, J. T. & Yacaman, M. J. (2005). The bacterial effect of silver nanoparticles. *Nanobiotechnology*, 16, 2346-2353.
15. Niedz, R. P. (1998). Isothiazolone biocides to control microbial and fungal contaminants in plant tissue cultures. *Hort Technology*, 8, 598-601.
16. Odutayo, O. L., Amusa, N. A. & Okutade, O. O. (2004). Microbial contaminants of cultured *Hibiscus cannabinus* and *Telfaria occidentalis* tissues. *African Journal of Agricultural Research*, 3(9), 473-476.
17. Odutayo, O. L., Amusa, N. A., Okutade, O. O. & Ogunsanwo, Y. R. (2007). Sources of microbial contamination in tissue culture laboratories in southwest Nigeria. *African Journal of Agricultural Research*, 2(3), 67-72.
18. Pal, S., Tak, Y. K. & Song, J. M. (2007). Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Applied and*

Environmental Microbiology, 1712-1720.
19. Petica, A., Floristean, V. & Gavriliu, S. (2008). Colloidal Nano-Silver solution obtained by electrochemical method: In vitro and in vivo evaluation of its antimicrobial activity. *Nanobioeurope*, June 09-13, Barcelona-Spain.
20. 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.
21. Roozbeh, F. (2004). *Production of doubled haploid sugarbeet lines resistant to curly top*. Final Report No. 83/1366. Publications of Agricultural Research and Education Organization (AREO). (In Farsi).
22. Ryan, J. (2008). *Understanding and managing cell culture contaminations*. Corning, Inc., Technical Bulletin. Available on: the Corning Life Sciences web site www.corning.com\lifesciences.
23. Salimi, M. & Alizadeh, P. (2009). Nano-Silver can be used to eradicate the bacterial contamination in tissue culture of *Rosa damascene* Mill. In: Proceedings of *the 2nd National Congress on Application of Nanotechnology in Agriculture*, October, 7-8, Karaj, Iran. (In Farsi).
24. Van Geyt, J. P. C., Speckmann, G. J., D'Halluin, K. & Jacobs, M. (1987). In vitro induction of haploid plants from unpollinated ovules and ovaries of the sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Theor Appl Genet*, 73, 920-925.
25. Yavari, N. (2007). *Production of doubled haploid lines tolerant to drought and salinity in sugar beet*. Final Report No. 86/314. Publications of Agricultural Research and Education Organization (AREO). (In Farsi).
26. Zeng, F., Hou, C., Wu, S., Liu, X., Tong, Z. & Yu, S. (2007). Silver nanoparticles directly formed on natural macroporous matrix and their anti-microbial activities. *Nanotechnology*, 18 055605 (8pp).