فصلنامه علمی - پژوهشی دانشگاه الزهرا(س)
دوره ۳۳ ، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۹

اثر بازدارندگی و مکانیسم نانوذرات نقره در کنترل رشد اگروباکتریوم رایزوژنز پس از همکشتی و انتقال ژن به توتون

مصطفی خوشحال سرمست [1]، حسن صالحی [2]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۱۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۶/۱۶

چکیده

هنوز تأثیر احتمالی نانوذرات نقره در کمک به فرایند انتقال ژن در گیاه از طریق اگروباکتریوم مورد توجه قرار نگرفته است. در تحقیق حاضر نشان داده می‌شود که رشد اگروباکتریوم در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر نانوذرات نقره هم در شرایط رشد دینامیک و هم محیط کشت جامد LB سرکوب می‌شود اما پس از همکشتی قطعات برگ توتون با A. rhizogenes، کنترل رشد مجدد این باکتری به طور موثری نیازمند غلظت‌های بالاتری از نانوذرات نقره است. استفاده از غلظت ۱۵۰ میکروگرم در میلی لیتر نانوذرات نقره و بالاتر باعث آسیب به بافت برگ می‌گردد و غلظت ۱۰۰میکروگرم در میلی لیتر در کنترل کامل باکتری پس از همکشتی موثر عمل نمی‌کند. بدین منظور مصرف همزمان نانوذرات نقره و سفوتاکسیم با غلظت‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که استفاده از ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر نانوذرات نقره به همراه ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم باعث کمترین آسیب به برگ و بیشترین درصد باززایی گردید و این روش کاربرد نه تنها باعث کاهش سمیت عناصر سنگین می‌شود بلکه باعث می‌شود از مصرف غلظت‌های بالای آنتی بیوتیک طی انتقال ژن اجتناب نماییم. نتایج میکروسکوپ الکترونی TEM نشان داد که نانوذرات نقره می‌تواند رشد اگروباکتریوم را با چسبیدن به دیواره باکتری و نفوذ به درون سلول باکتری و اختلال در کار اندامک‌های مختلف متوقف نماید. نتایج بدست آمده از این آزمایش می‌تواند راه را برای استفاده از نانوذرات نقره با قطر کمتر برای توقف رشد مجدد باکتری طی انتقال ژن در گیاهان مختلف هموار نماید.

واژه‌های کلیدی: ***اگروباکتریوم رایزوژنز، توتون، مهندسی ژنتیک، میکروسکوپ الکترونی.***

۱- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده تولیدات گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
*(نویسنده مسئول: mkhsarmast@gau.ac.ir)
۲- استاد گروه علوم باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

مقدمه

واژه‌ی فناوری "نانو" اولین بار در یک سخنرانی با عنوان "وجود فضاهای زیادی در پایین دست" به وسیله یک فیزیکدان به نام ریچارد فینمن (Richard Phillips Feynman) در گردهمایی جامع فیزیک آمریکا در انیستیتو فناوری کالیفرنیا در ۲۹ دسامبر سال ۱۹۵۹ مطرح شد که به معنی فناوری با مواد در اندازه ۱ تا ۱۰۰ نانومتر است. نانو برگرفته از یک واژه‌ی یونانی به معنای پاکوتاه یا بسیار کوچک است. امروزه نانوزیست فناوری (Nanobiotechnology) یا زیست‌نانو فناوری (Bionanotechnology) به ترتیب اشاره به کاربرد فناوری نانو در رشته زیست فناوری و کاربرد زیست فناوری در حوزه فناوری نانو دارد (سرمست و صالحی، ۲۰۱۶). فناوری نانو به جزء جدایی ناپذیری از صنایع پزشکی، کشاورزی، الکترونیک، پوشاک، صنایع بسته‌بندی و غیره تبدیل شده است و یکی از فناوری‌های بسیار پیشرفته‌ای است که به وسیله بشر به وجود آمده است .

(Kmari et a., 2008 , Arora et al., 2008) نانومواد و نانوماشین‌ها به شدت در حال استفاده و رشدند. تولید نانوذرات طلا و نقره به کمک گیاه به یک گزینه منطقی برای کنترل مالاریا به عنوان یک ابزار دوستدار طبیعت مطرح شده است (Benelli, 2016). در طبیعت نقره به فرم مونووالنت همراه با سولفید، بیکربنات یا سولفات یا به صورت پیچیده‌تر با کلریدها و سولفات‌های جذب شده بر روی مواد ویژه در حالت مایع دیده می‌شود. پس از تولید پنسیلین در سال ۱۹۴۰ کاربرد ضد میکروبی نقره کاهش یافت، اما مجددا در سال ۱۹۶۰ به دلیل ظهور باکتری‌های مقاوم به پنسیلین مورد استفاده قرار گرفت. ترکیبات دارای نمک نقره برای درمان برخی از بیماری‌ها از جمله اعتیاد به نیکوتین، صرع، بیماری‌های عفونی شامل سفیلیس و سوزاک استفاده می‌شد (Marshall & Schneider, 1977). استفاده از سولفادیازین نقره در ناحیه‌ی سوخته شده برای جلوگیری از آلودگی قارچی و باکتریایی کاربرد دارد (Klasen, 2000). در زمینه‌ی کشاورزی بیشترین کاربرد نانوذرات نقره مربوط به ترکیبات ضدمیکروبی و کاربرد تغذیه‌ای می‌شود. قارچ‌ها و باکتری‌های درونی از جمله موانعی هستند که استقرار گونه‌های گیاهی به خصوص گونه‌های چوبی را با مشکل مواجه می‌سازند (سرمست و همکاران، ۲۰۱۱). کاربرد آنتی‌بیوتیک‌های متداول و مواد شیمیایی با اثر سمی منجر به توقف رشد گیاه می‌شوند (Dodds & Roberts, 1981). علاوه بر این موارد، قرار گرفتن طولانی مدت بافت گیاه در معرض این ترکیبات، خطر تولید باکتری‌های مقاوم را افزایش می‌دهد (Falkiner, 1990). به‌عنوان مثال ویژگی سمیت آنتی بیوتیک‌های ریفامپسین، کربنسلین، استرپتومایسین در گل‌های کلماتیس، دلفنیوم، هوستا، زنبق و همچنین فوتینیا آشکار شده است (Leifert *et al*., 1992). استفاده از آنتی بیوتیک‌ها ممکن است در کنترل آلودگی میکروبی و به عنوان عامل گزینش در مطالعات گزینش سلول‌های تراریخت موثر باشد اما ممکن است اثرات منفی در محدودیت باززایی ریز نمونه‌ها و پایداری ژنتیکی آنها ایجاد نماید (Teixeira da Silva *et al*., 2003). پرآوری و ریشه‌زایی گیاهان دلفنیوم به وسیله‌ی آنتی بیوتیک‌ها در محیط کشت شاخساره متاثر شده است (Leifert *et al*., 1992). بنابراین استفاده از نانومواد به ویژه آنهایی که دارای فعالیت ضد میکروبی، پایداری دمایی

بالا و قابلیت تبخیر پایین باشند برای گندزدایی و استقرار ریز نمونه‌های گیاهی قابل کاربرد خواهند بود. اولین گزارش استفاده از نانوذرات نقره در کنترل آلودگی میکروبی بر روی گیاه علفی سنبل‌الطیب به وسیله ابدی و همکاران (۲۰۰۸) گزارش شد.

انتقال ژن با واسطه‌گری اگروباکتریوم به‌طور معمول با رشد دوباره باکتری‌های مایه‌زنی شده با ریز نمونه پس از هم کشتی مواجه است. عدم حذف این باکتری‌های اضافی و جلوگیری از رشد مجدد آنها که می‌تواند منجر به مرگ ریز نمونه گردد، یکی از موانع مهم انتقال ژن با واسطه‌گری اگروباکتریوم محسوب می‌شود. استفاده از آنتی بیوتیک‌های سفوتاکسیم، کربنسلین، تایمنتین، مروپنین و غیره برای کنترل رشد دوباره باکتری مرسوم است. اما با این حال برخی از پیامدهای منفی ناشی از استفاده از این آنتی‌بیوتیک‌ها مانند اثر سمیت، کاهش رشد گیاه و ممانعت از باززایی در کنار قیمت بالای بسیاری از آنها نیز گزارش شده است و قرار گرفتن طولانی مدت ریز نمونه با این مواد، خطر تولید باکتری‌های مقاوم را نیز بالا می‌برد. یک عقیده کلی در رابطه با آنتی بیوتیک‌ها وجود دارد که آنها بایستی پایدار و به‌راحتی قابل حل باشند، بایستی تحت تاثیر pH و نوع محیط کشت قرار نگیرند و بر روی گستره‌ی وسیعی از باکتری‌ها خاصیت کشندگی داشته باشند. یک آنتی بیوتیک خوب بایستی قابلیت آمیخته شدن با دیگر ترکیبات را داشته و برای انسان سمیت نداشته و ارزان باشد و منجر به القاء مقاومت به باکتری نگردد. اگرچه که آنتی بیوتیک‌هایی با تمام این ویژگی‌ها شاید در دسترس نباشد. اشاره شده است که آنتی بیوتیک‌های با پایه بتا لاکتام مانند سفوتاکسیم قادر به توقف سنتز دیواره‌ی سلولی از طریق اتصال به پپتیدوگلیکان ترانسپپتیداز و لیز نمودن سلول است .

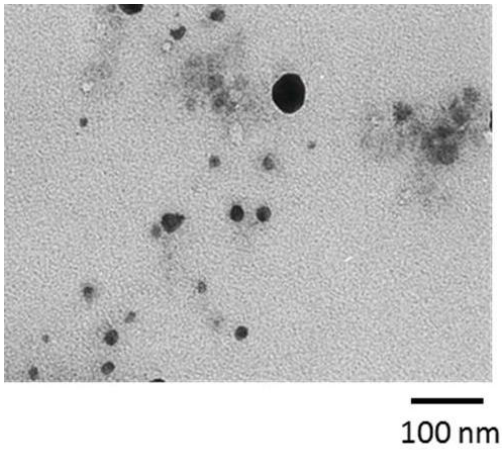
(Selwyn *et al*., 1980). تعداد قابل توجهی از گزارشات در رابطه با اثر بازدارندگی آنتی بیوتیک‌های کربنسلین و سفوتاکسیم (از دسته بتا لاکتایم) بر رشد سلول‌های گیاهی، رویان‌زایی و اندام‌زایی برخی گیاهان علفی و چوبی مانند پرتقال موجود است (Ogawa & Mii, 2005). در رابطه با گیاهان چوبی، اثر آنتی بیوتیک‌های بتا لاکتایم در رشد و مورفوژنز ریز نمونه به‌طور گسترده مورد بررسی قرار نگرفته است. da Silva و همکاران (2003) گزارش نمودند که سفوتاکسیم طی انتقال ژن به کمک اگروباکتریوم رشد شاخساره پرتقال را در شرایط درون شیشه‌ای کاهش می‌دهد. تماس طولانی مدت آنتی بیوتیک با ریز نمونه نه تنها احتمال خطر سوختگی ریز نمونه را بالا می‌برد بلکه در طولانی مدت، خطر تولید باکتری‌های مقاوم افزایش خواهد یافت. این ایجاد مقاومت به احتمال زیاد با سازوکار منفرد توقف سنتز دیواره سلولی باکتری مربوط خواهد بود. این مقاومت باکتریایی طی سال‌های اخیر به دلیل گسترش سویه‌های مقاوم افزایش یافته است (Thomas & Broadbridge, 1972). درجه‌ی بالایی از مقاومت به کربنسلین در سویه‌های *Pseudomonas aeruginosa* مشاهده شده است. کاربرد نانوذرات نقره به دلیل سازوکار عمل متفاوت آنها یکی از گزینه‌ها است. علاوه بر اثر ضد میکروبی این ترکیبات، اثر مثبت نقره در رشد و نمو گیاه نیز پیش‌تر گزارش شده است (Parimalan *et al*., 2011, Wang *et al*., 2013b, Gupta *et al*., 2018). افزایش فعالیت شیمیایی نانوذرات تا حد زیادی مربوط به ساختار سطحی کریستالوگرافی و داشتن سطوح بالاتر نسبت به حجم است که اجازه می‌دهد

مقادیر بیشتری از اتم با محیط اطرافش در تماس باشد (Wijnhoven *et al*., 2009). یون‌های نقره با گروههای سولفیدریل (-SH) پروتئین‌ها برهمکنش و رشد باکتری را از طرفی با توقف فعالیت آنزیم‌های تنفسی و اجزاء زنجیره‌ی انتقال الکترون متوقف و عمل DNA را دچار اخلال می‌کند (Bragg & Rannie, 1974, Batarseh, 2004, Wang *et al*., 2013b)، همچنین برهمکنش آنها با باندهای هیدروژنی آشکار شده است. هدف این پژوهش بررسی مقدماتی غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره در دو محیط مایع و جامد بر توقف رشد اگروباکتریوم رایزوژنز و تومافشینس و استفاده از نانوذرات نقره و سفوتاکسیم برای کنترل رشد دوباره‌ی اگروباکتریوم رایزوژنز پس از همکشتی آن با توتون طی انتقال ژن می‌باشد.

مواد و روش‌ها

ویژگی‌های نانوذرات نقره

متوسط اندازه نانوذرات استفاده شده در این مطالعه ۱۸/۵ نانومتر بود. شکل ۱ مربوط به تصاویر میکروسکوپ الکترونی انتقالی ذرات نانو نقره است. نانوذرات نقره به فرم کلوئید و با غلظت مشخص از شرکت Qtechnano هند خریداری شد.



شکل ۱: تصویر میکروسکوپ الکترنی TEM

آزمایش باکتری کشی

برای ارزیابی حداقل غلظت نانوذرات که باعث کاهش و توقف رشد باکتری می‌شود از دو باکتری *Agrobacterium rhizogenes* سویه K599 و *Agrobacterium tumefaciense* سویه LBA4404 استفاده شد.

کشت در محیط مایع

در این آزمایش رشد دو باکتری در محیط دینامیک (مایع) LB (تریپتون ۱۰ گرم در لیتر، کلرید سدیم ۵ گرم در لیتر و عصاره‌ی مخمر ۵ گرم در لیتر) در حضور مقادیر متفاوتی از نانوذرات نقره مورد بررسی قرار گرفت. اگروباکتریوم رایزوژنز و تومافشینس به‌طور جداگانه در ۱۰۰ سانتیمتر مکعب محیط LB حاوی ۵، ۱۰، ۱۵،۲۰، ۲۵ و ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات

رشد داده شدند (مقدار $۲×۱۰^{۸}$ واحد تشکیل دهنده کلونی (CFU) از کشت مایع LB با غلظت ۰/۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر به هر لوله‌ی آزمایش برای شروع کشت اضافه شد). میزان رشد و غلظت باکتری با ۵ وقفه‌ی ۵ ساعته در طول موج ۶۰۰ نانومتر به کمک اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد. نمونه‌ی فاقد نانوذرات نقره به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. هر تیمار دارای سه تکرار بود.

کشت در محیط جامد

در این آزمایش مقادیر $۱۰^{۵}$ واحد تشکیل دهنده کلونی (CFU) از اگروباکتریوم رایزوژنز و تومافشینس بر روی محیط جامد LB با ۱۰ گرم در لیتر آگار کشت داده شدند. به این محیط‌های کشت مقادیر متفاوتی از نانوذرات نقره (صفر، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) افزوده شد. پتری‌دیش‌های کشت شده به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و تعداد کلونی‌های رشد یافته پس از ۴۸ ساعت شمارش شدند (هر تکرار حاوی سه پتری دیش بود و میانگین آنها محاسبه گردید).

آنالیز TEM

برهمکنش اگروباکتریوم رایزوژنز با نانوذرات نقره به کمک میکروسکوپ الکترونی TEM مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور باکتری‌ها در محیط مایع‌ی دارای ۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نانوذرات نقره برای ۳ ساعت رشد داده شدند (در روی شیکر با دور ۱۵۰ RPM و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد). برای شروع رشد مقدار $۱۰^{۸}$ CFU از باکتری مایع به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط LB اضافه شد. پس از ۳ ساعت، نمونه به سرعت و به مدت کوتاه سانتریفیوژ شد و رونشین دور ریخته شد. ته‌نشین باقی مانده با گلوترآلدهید ۴درصد ثابت شد. پس از طی نمودن روش‌های نرمال مانند شستشو، آبگیری، اینفیلتریشن و جایگیری نمونه در رزین و پلیمریزه نمودن نمونه، نمونه را به کمک دستگاه اولترامیکروتوم برش (قطر مقطع برش داده ۶۰ نانو متر بود) دادیم و پس از رنگ آمیزی خشک نمودیم و بر روی گِرِید مسی پوشیده از کربن برای ورود به دستگاه میکروسکوپ الکترونی قرار دادیم. ولتاژ استفاده شده ۱۰۰ کیلو ولت و نوع دستگاه فیلیپس بود.

انتقال ژن با واسطه‌گری اگروباکتریوم رایزوژنز

سویه باکتری و حامل دوتایی

در این آزمایش تنها از *A. rhizogenes* سویه K599 دارای پلاسمید دارای حامل دوتایی PKGWF7.0 که دارای پروموتر ویروسِ موزائیکِ گلِ کلم و ژن گزارشگر *Gus* به عنوان نشانگر گزارشگر و ژن *nptII* (نئومایسین فسفوترانسفراز) به عنوان نشانگر گزینشگر بود استفاده شد.

کشت باکتری و آماده‌سازی

باکتری مد نظر در محیط کشت LB حاوی ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی بیوتیک اسپکتینومایسین برای گزینش کشت داده شد (در سرعت ۲۰۰ rpm به مدت یک شب در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد). سپس باکتری با سرعت ۲۵۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد رسوب داده شد و دوباره در ۱۰ تا ۱۵ میلی لیتر محیط مایع نیم غلظت MS (Murashige and Skoog, 1962) حل شد و غلظت باکتری در طول موج ۶۰۰ نانومتر بسته به ریز نمونه استفاده شده در محدوده ۰/۱ تا ۰/۸ تنظیم شد و ۱۰۰ میکرومولار استوسرینگون پیش از مایه زنی به آن افزوده شد.

انتقال ژن و تیمار نانوذرات نقره در مرحله همکشتی

رقم Samsun از توتون برای تست انتقال ژن استفاده شد. برای این منظور برگ‌های کاملاً نمو یافته‌ی توتون رشد یافته در گلخانه جدا و به آزمایشگاه منتقل شد. برگ‌ها ابتدا با آب استریل آبکشی شدند و با ۰/۲درصد توین ۲۰ برای ۵ دقیقه تیمار شدند و پس از آبکشی، با کلراکس ۲۰ درصد برای ۵ تا ۶ دقیقه گندزدایی سطحی و در انتها برای چند بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. قطعات برگ در شرایط استریل به قطعات ۰/۵ سانتیمتر مربعی بریده شدند و با محلول باکتری آماده شده از پیش، به مدت ۲۰ تا ۲۵ دقیقه مایع زنی شدند، سپس قطعات برگ روی کاغذ صافی استریل تا حدودی خشک و برای همکشتی به محیط MS دارای ۲ میلی‌گرم درلیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم درلیتر NAA منتقل شدند. پس از حداکثر سه روز همکشتی، قطعات برگ مجدداً با ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم شستشو شد و پس از خشک شدن به محیط دارای غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره و سفوتاکسیم (جدول ۱) برای کنترل باکتری و BAP و ۷۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین برای گزینش منتقل شد. در زیر کشت‌های بعدی غلظت کانامایسین به ۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر رسانده شد. شاخساره‌های نابجای تولید شده جدا و پس از فروبری سریع در ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر IBA برای ریشه‌زایی کشت شدند. کشت‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و نور فلورسنت نگه‌داری شدند.

جدول ۱: تیمارهای ترکیبی استفاده شده برای کنترل رشد مجدد باکتری پس از همکشتی با اگروباکتریوم رایزوژنز

تیمارها	غلظت(µg/ml)
Cefotaxime	200
Cefotaxime	300
Cefotaxime+ AgNPs	150+150
Cefotaxime+ AgNPs	200+150
Cefotaxime+ AgNPs	150+200
AgNPs	200
AgNPs	300

AgNPs: نانوذرات نقره
Cefotaxime: سفوتاکسیم

استخراج DNA از برگ توتون‌های مقاوم در برابر کانامایسین

برای استخراج DNA از روش Stange و همکاران (1998) استفاده شد. مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت برای استخراج در نظر گرفته شد. DNAهای استخراج شده در دمای °۲۰- سانتی‌گراد نگه‌داری شد. DNAهای مورد نظر روی ژل آگاروز ۱درصد برای بررسی کیفیت DNA قرار داده شدند.

انجام PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی

برای تایید تراریخت بودن گیاهان تولید شده و برای تایید عدم حضور باکتری اضافی در بافت گیاهان باززایی شده، از دو جفت آغازگر مربوط به ژن *gus* (این ژن در سازه ژنی وجود دارد) و *C58* (برای تایید عدم وجود خود باکتری در بافت) استفاده شد. اندازه پیش‌بینی شده قطعه تکثیر شده برای ژن *Gus* و *C58* به ترتیب ۸۱۱ و ۴۲۵ جفت باز می‌باشد. پس از گرفتن توالی آغازگر از سایت NCBI، این آغازگرها طراحی (جدول ۲) و به کمک نرم‌افزار تحت وب OligoCal، کیفیت و دمای اتصال آنها آشکار شد. در نهایت برای اطمینان از اختصاصی بودن آنها، هر کدام از توالی‌های پیشرو و پسرو در NCBI مورد جستجوی BLAST قرار گرفتند.

جدول ۲: اطلاعات و توالی آغازگرهای طراحی شده مربوط به ژن‌های استفاده شده در این مقاله

نام ژن	توالی
c58	F, 5'-CCTTGGGCGTCGTCATAC-3' R, 5'-TCGTCCTCGGTCGTTTCC-3'.
gus	F, 5'- GCAATTGCTGTGCCAGGCAG -3' R, 5'- CGTGCACCATCAGCACGTTAT -3'

حجم نهایی هر واکنش ۲۰ میکرولیتر بود که حاوی ۱۰ نانوگرم از DNA، ۲ میکرولیتر از بافر PCR x۱۰، ۰/۷ میکرولیتر از کلرید منیزیم (۵۰ میلی‌مولار)، ۰/۵ میکرولیتر از dNTPs ۱۰ میلی‌مولار، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر پیشرو و پسرو (غلظت محلول آغازگر ۱۰ میکرومولار بود) و ۰/۳ واحد از Taq DNA polymerase (Sinnagen, Iran) بود. آمیخته‌ی حاضر پس از افزودن آب دو بار تقطیر استریل به حجم ۲۰ میکرولیتر رسانیده شد و در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد (جدول ۳). محصول PCR به‌دست آمده روی ژل آگاروز ۱درصد که با safe stain رنگ آمیزی شده بود با ولتاژ ۸۰ رانده شد و وضعیت نوار با استفاده از دستگاه تصویر برداری Gel Documentation System شرکت کیاژن (ساخته شده در چین) بررسی شد.

جدول ۳:برنامه چرخه های دمایی مورد نیاز برای انجام PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر.

تعداد دور	مرحله	دوره (دقیقه)	دما (سانتی‌گراد)
۱	واسرشت	۴ (دقیقه)	۹۴
	واسرشت	۳۰ (ثانیه)	۹۴
۳۵	اتصال	۳۰ (ثانیه)	۵۶-۵۰
	گسترش	۱ (دقیقه)	۷۲
۱	گسترش نهایی	۱۰ (دقیقه)	۷۲
۱	نگهداری نهایی		۴

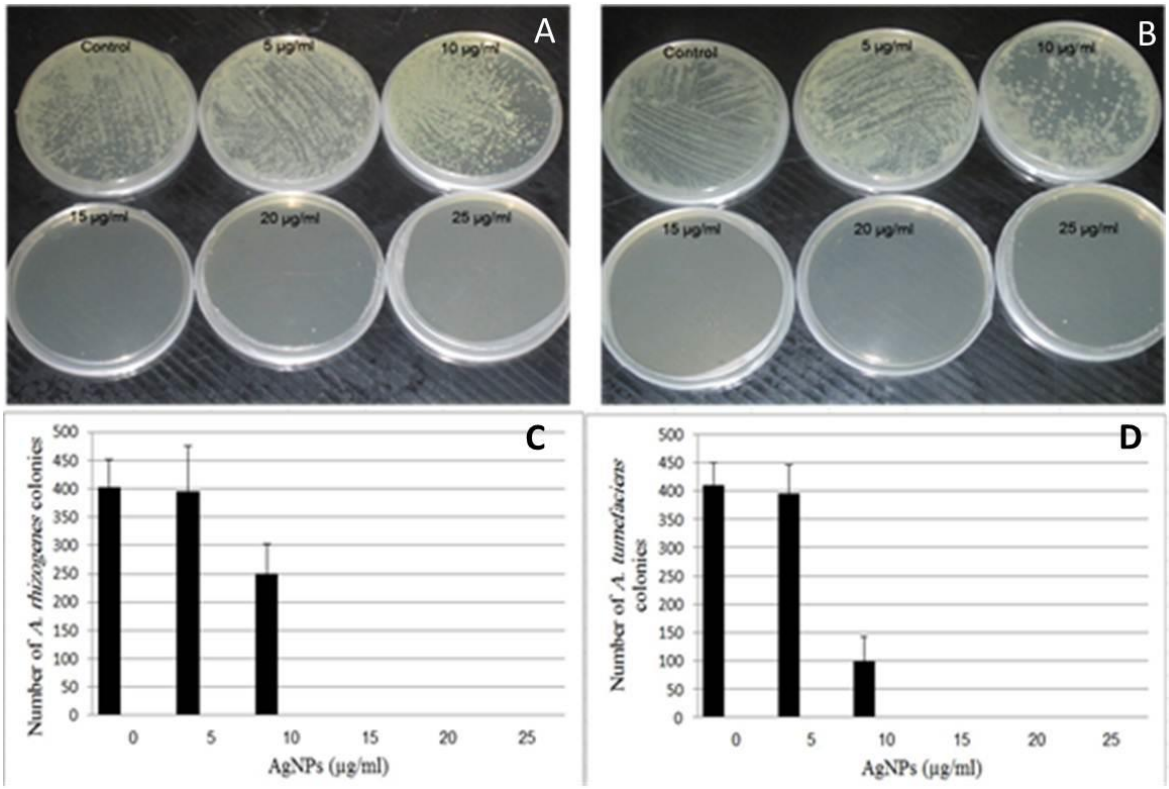
تجزیه‌ی داده‌ها

هر کدام از آزمایشات حداقل با سه تکرار در هر تیمار انجام شد. در رابطه با آزمایشات انتقال ژن در هر تکرار از ۴۰ ریز نمونه استفاده شد به این معنی که هر تیمار حداقل شامل ۱۲۰ ریز نمونه می‌شد. کل آزمایشات مربوط به انتقال ژن بارها تکرار شد (حداقل ۵ بار) تا نتیجه دلخواه حاصل شود. تجزیه و تحلیل داده‌ها عموماً با آخرین نسخه نرم افزار R (۳,۴,۲ نسخه) انجام شد.

نتایج و بحث

زیست آزمون نانوذرات نقره در محیط کشت جامد

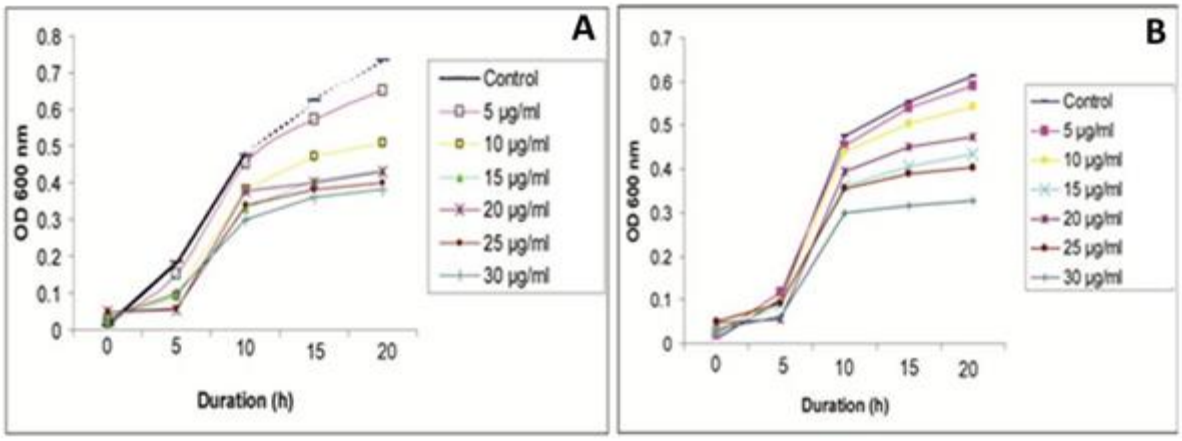
نتایج زیست آزمون نانوذرات نقره که با غلظت‌های مختلف در محیط جامد بر روی دو گونه مشهور اگروباکتریوم طی ۲۴ ساعت مورد بررسی قرار گرفت در شکل ۳-۱ آمده است. نتایج نشان می‌دهد که هر دو گونه‌ی باکتری در محیط جامد LB در غلظت‌های بیش از ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر قادر به رشد نمی‌باشند و این غلظت کمترین غلظت نانوذرات نقره برای کنترل این دو باکتری گرم منفی به حساب می‌آید. نتایج نشان می‌دهد زمانی که غلظت نانوذرات نقره از ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر به ۱۰ می‌رسد میزان رشد باکتری نسبت به شاهد در مورد اگروباکتریوم تامیفشینس ۳ برابر کاسته می‌شود.



شکل ۲: A: باکتری اگروباکتریوم رایزوژنز که در غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره کشت شده است B: باکتری اگروباکتریوم تامیفشینس که در غلظت های مختلف نانوذرات نقره کشت شده است. C و D به ترتیب مربوط به نتایج کمی شده تعداد کلونی های رشد یافته در هر پتری می‌باشد. اعداد میانگین ۳ پتری‌دیش می باشد.

زیست آزمون نانوذرات نقره در محیط کشت مایع

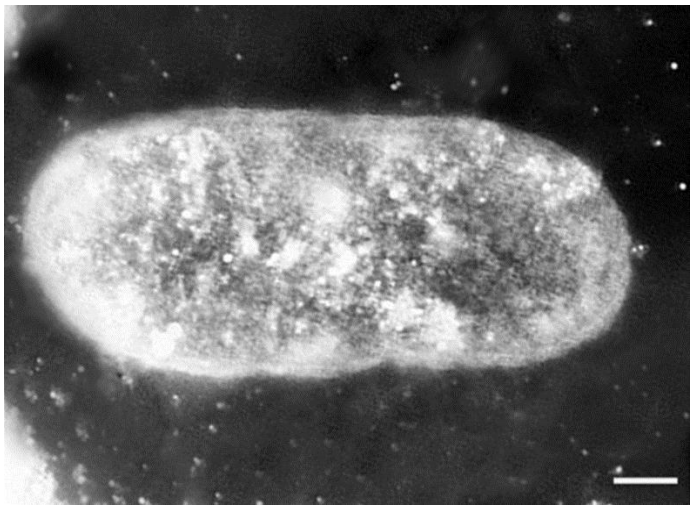
نتایج کشت مایع نیز از روند رشد مشابه‌ای پیروی می‌کند به شکلی که در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر حتی پس از گذشت ۱۵ تا ۲۰ ساعت از شروع کشت همچنان باکتری‌ها در حال رشد می‌باشند هرچند که میزان رشد باکتری‌ها در محیط فاقد نانوذرات در مورد هر دو باکتری بیشتر است. با افزایش غلظت از ۱۰ به ۱۵ و بیشتر میزان رشد به حالت خطی و ثابت در می‌آید که نشان دهنده‌ی توقف رشد باکتری‌هاست. این روند توقف رشد باکتری به خصوص ۱۰ ساعت پس از شروع کشت به شکل آشکارتری در شکل ۳ قابل مشاهده است.



شکل۳: A: منحنی رشد اگروباکتریوم رایزوژنز در محیط کشت مایع و B: منحنی رشد اگروباکتریوم تامی‌فشینس در محیط کشت مایع. سمت راست هر دو شکل غلظت نانوذرات به کار رفته به صورت میکروگرم در میلی‌لیتر نمایش داده شده است.

اثر نانوذرات نقره بر سلول اگروباکتریوم رایزوژنز

بررسی‌هایی که با استفاده از میکروسکوپ الکترونی TEM بر روی اگروباکتریوم رایزوژنز که تحت تاثیر ۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نانوذرات نقره تنها به مدت ۳ ساعت بود نشان از اتصال نانوذرات نقره به دیواره و نفوذ شدید این نانوذرات به درون غشاء باکتری دارند. حتی نانوذرات با قطر بیش از ۱۸ نانومتر و یا کوچکتر از آن نیز در درون سلول باکتری قابل مشاهده می‌باشند.



شکل ۴: تصویر میکروسکوپ TEM بر سلول اگروباکتریوم تامفشینس که تحت تاثیر ۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نانوذرات نقره به مدت ۳ ساعت قرار داشت. مقیاس ارائه شده ۱۰۰ نانومتر است.

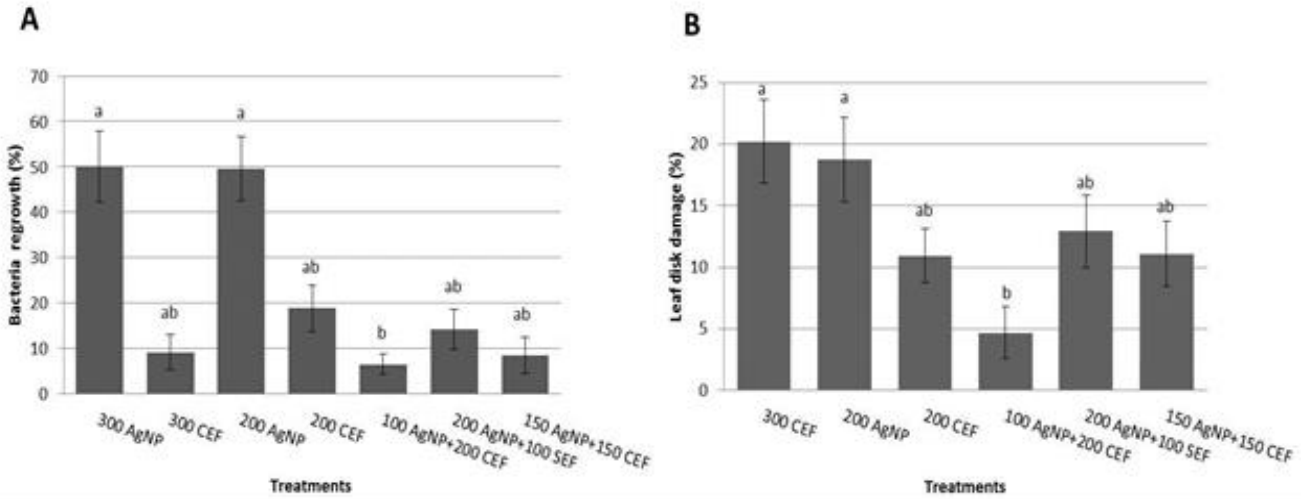
برای پرده برداشتن از چگونگی اثر نانوذرات و کاهش رشد باکتری، آزمایشی با میکروسکوپ الکترونی TEM صورت گرفت که نشان داد باکتری‌هایی که به مدت سه ساعت با نانوذرات نقره در تماس بوده‌اند به شدت از نانوذرات متاثر می‌شوند. تصاویر

بیانگر نفوذ نانوذرات به تمام قسمت‌های سلول باکتری است که به‌راحتی می‌توان حدس زد که نانوذرات نقره نه تنها غشاء باکتری را تخریب می‌نماید بلکه به سادگی با ماده ژنتیکی باکتری (DNA) در درون سلول و بسیاری از پروتئین‌های باکتریایی برهمکنش دارد و رشد باکتری را متوقف می‌نماید (Braydich-Stolle *et al*., 2005, Shrivastava *et al*., 2007). اثر نانوذرات نقره در کاهش رشد سه باکتری اشرشیاکولای، باسیلوس سابتلیس و اگروباکتریوم تامیفشینس پیش‌تر گزارش شده است (Wang *et al*., 2012). این محققین تنها ۱۰ ساعت رشد در محیط کشت را مورد بررسی قرار دادند و گزارش نمودند که غلظت ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر به طور کامل باعث توقف رشد اگروباکتریوم می‌شود ولی این غلظت منجر به توقف رشد دو باکتری استفاده شده در آزمایش حاضر نگردید و غلظت‌های بالاتری از نانوذرات نقره برای توقف رشد باکتری‌ها نیاز بود. این تفاوت تا حدی می‌تواند مربوط به خصوصیات شیمیایی، پوشش و اندازه نانوذرات و شرایط کشت در این دو آزمایش باشد. در گزارشی دیگر اثر نانوذرات نقره سنتز شده در *Pseudopediastrum boryanum* بر روی رشد برخی از باکتری‌های گرم مثبت مانند *Listeria monocytogenes* ، *Enterococcus faecalis* و گرم منفی مانند *Proteus mirabilis*، *Enterobacter aerogenes* و غیره تاثیر گذار نبود (Duygu *et al*., 2019). در گزارشی دیگر نانوذرات سنتز شده در قارچ *Trichoderma* اثر بازدارندگی قابل قبولی در غلظت ۲/۵ میلی‌مولار بر روی بیماری کنکر گوجه‌فرنگی (*Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*) داشتند (Noshad *et al*., 2019). اثر بازدارندگی نانوذرات تولید شده به‌وسیله گیاهان بر روی پاتوژن‌های انسانی و غیر انسانی توسط دیگران نیز گزارش شده است (Tortella *et al*., 2019).

نتایج مربوط به انتقال ژن در توتون

بررسی‌های اولیه صورت گرفته برای کنترل رشد دوباره باکتری‌ها در محیط کشت پس از همکشتی به طور شگفت‌آوری حاکی از غیر موثر بودن غلظت ۱۵ میکروگرم در میلی لیتری بود که در آزمایش زیست سنجی بدست آورده بودیم. بدین منظور غلظت‌های بسیار بالاتری از نانوذرات و حتی ترکیب آنها با سفوتاکسیم به عنوان یک آنتی بیوتیک معمول در انتقال ژن، مورد بررسی قرار گرفت. از طرفی غلظت‌های بالاتر از ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تا حدود ۵۰ درصد رشد باکتری را کاهش داد اما منجر به سوختگی برگ می‌شد. نتایج بررسی ما به صورت درصد رشد مجدد باکتری و میزان آسیب ترکیبات استفاده شده به صفحات برگی در توتون نشان داده شده است (شکل ۵). نتایج نشان می‌دهد که غلظت‌های بیش از ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از نانوذرات نقره منجر به آسیب و سوختگی برگ می‌شود. از این رو حالت ترکیبی نانوذرات با سفوتاکسیم در نظر گرفته شد که نتایج بدست آمده نشان داد ترکیبی از ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات نقره در ترکیب با ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم نه تنها رشد مجدد باکتری را به شدت کاهش داد حتی ریزنمونه درصد سوختگی کمتری را نیز نشان داد. اگرچه که استفاده از ۲۰۰

و ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم میزان رشد باکتری را به شدت کاهش داد ولی غلظت ۳۰۰ منجر به سوختگی برگ و غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم به‌تنهایی به اندازه استفاده ترکیبی نانوذرات نقره و سفوتاکسیم موثر عمل نکرد.



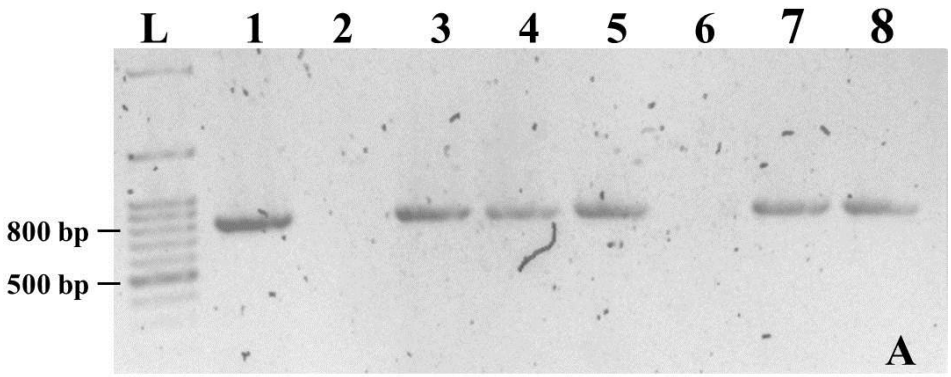
شکل ۵: اثر ترکیبی و تنهای نانوذرات نقره و سفوتاکسیم افزوده شده به محیط کشت باززایی توتون پس از همکشتی با اگروباکتریوم رایزوژنز. این محیط حاوی کانامایسین برای گزینش سلول‌های تراریخت و ۲ میلی‌گرم در لیتر BA برای باززایی گیاهان می‌باشد. A: درصد رشد باکتری و B: درصد آسیب (به صورت درصد ریز نمونه در هر پتری‌دیش) به صفحات برگ توتون را نشان می‌دهد (توجه: تمام غلظت‌ها به صورت میکروگرم در میلی‌لیتر یا میلی‌گرم در لیتر است).

نتایج زیست‌سنجی به روشنی بیانگر این است که غلظت بیش از ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر باعث توقف رشد باکتری در محیط LB می‌شود اما نکته‌ی جالب این است که این غلظت نانوذرات نقره به هیچ عنوان برای توقف رشد باکتری پس از همکشتی با ریز نمونه‌های توتون کافی نبوده است. غلظت‌های بین ۲۰ تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر برای کنترل باز رشد باکتری طی انتقال ژن موثر نبود و غلظت‌های حدود ۲۰۰ و بالاتر اثر سمیت بر روی برگ‌های جوان و تازه‌ی توتون داشت. از نقطه نظر کاربردی مشخص شد که حالت ترکیبی نانوذرات با آنتی بیوتیک به نسبت ارزان قیمت سفوتاکسیم، منجر به نتایج به مراتب بهتری از استفاده تکی هر یک از این دو ماده ضد میکروبی می‌شود. اثرات سمیت نانوذرات نقره و سفوتاکسیم در گزارش‌های زیادی مشاهده می‌شود. در محیط کشت دارای ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نانوذرات نقره و ۱۰۰ میلی‌گرم درلیتر سفوتاکسیم مقادیر کمتری باززایی در مقایسه با محیط ترکیبی دارای ۲۰۰ میلی‌گرم درلیتر سفوتاکسیم و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نانوذرات نقره مشاهده می‌شود. این اثر شاید مربوط به اثر سمیت نانوذرات بر روی سلول‌های گیاهی به‌ویژه بر روی توتون باشد که پیشتر نیز گزارش شده است (Batarseh, 2004). گزارش‌های زیادی وجود دارد که اثر نانوذرات نقره در تحریک رشد گیاه را در شرایط درون شیشه‌ای تایید می‌کند (سرمست و همکاران، ۲۰۱۵، عقدایی و همکاران،۲۰۱۲، Wang *et a.l*, 2013)، حتی اثر مثبت سفوتاکسیم در باززایی گیاه نیز پیش‌تر گزارش شده است (Leifert *et al*., 2000). نتایج بدست آمده نشان داد که در همکشتی ریز نمونه‌ها

با اگروباکتریوم رایزوژنز نه تنها بافت‌ها آسیب کمتری در برگ‌های خود دیدند بلکه توقف رشد دوباره باکتری به مراتب در محیط دارای ۲۰۰ میلی‌گرم درلیتر سفوتاکسیم و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نانوذرات نقره بهتر بود. به نظر می‌رسد که ترکیب این دو آنتی بیوتیک در بهبود رشد توتون و توقف رشد اگروباکتریوم رایزوژنز بهتر بوده است. بایستی به این نکته توجه نمود که استفاده از آنتی بیوتیک‌های معمول که در فرایند انتقال ژن مورد استفاده قرار می‌گیرد نه‌تنها ریسک مقاومت به باکتری را به دلیل وجود یک سازوکار عمل، بالا می‌برند بلکه ممکن است قابلیت باززایی ریز نمونه و توانایی ریشه‌زایی آن را تا حد زیادی متاثر نمایند. پژوهشگرانی اعلام کرده‌اند که برخی آنتی‌بیوتیک‌ها به شدت باززایی شاخساره و به‌ویژه تشکیل ریشه را متاثر می‌نمایند (da Silva *et al*, 2003). به نظر می‌رسد کاربرد همزمان دو ترکیب ضد باکتری با نصف غلظت، بسیار موثرتر از استفاده هر کدام به تنهایی می‌باشد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تایید تراریختی گیاهک‌های توتون

از میان گیاهک‌های باززایی شده در محیط دارای نانوذرات نقره و سفوتاکسیم، آنهایی که در محیط گزینشیِ ۱۰۰ میلی‌گرم درلیتر از آنتی بیوتیک کانامایسین (به دلیل وجود ژن نشانگر گزینشکر *NPTII*) قادر به رشد بودند به صورت تصادفی DNA استخراج و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به کمک دو آغازگر *gus* و *c58* انجام شد. نتایج بدست آمده (شکل ۶) نشان از تکثیر قطعه ۸۰۰ جفت بازی مربوط به ژن *gus* دارد که در پلاسمید LBA4404 وجود دارد اما هیچ اثری از تکثیر قطعه ۴۲۵ جفت بازی که نشان از وجود آلودگی با خود باکتری در بافت است، دیده نمی شود.



شکل ۶: نتایج واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز مربوط به تایید تراریختی توتون با ژن *gus*. L مربوط به نشانگر بیولوژیک. لاین ۱ مربوط به کنترل مثبت مربوط به ژن *Gus* که از خود باکتری به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. ستون‌های ۲ مربوط به محصول PCR ژن *C58* و سطون های ۳تا ۸ مربوط به ۶ گیاهی بود که به صورت تصادفی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به کمک آغازگرهای ژن *Gus* برای تایید تراریختی بر روی آنها انجام شد.

در مجموع نتایج شفاف این تحقیق نشان می‌دهد که رشد اگروباکتریوم در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات نقره هم در شرایط رشد دینامیک و هم محیط کشت جامد LB سرکوب شد اما پس از همکشتی قطعات برگ توتون با *A. rhizogenes*، کنترل رشد مجدد این

باکتری به طور موثری نیازمند غلظت‌های بالاتری از نانوذرات نقره بود. نتایج نشان داد که استفاده از غلظت ۱۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و بالاتر نانوذرات نقره باعث آسیب به بافت برگ می‌گردد و غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در کنترل کامل باکتری پس از همکشتی موثر عمل نمی‌کند. بدین منظور مصرف همزمان نانوذرات نقره و سفوتاکسیم با غلظت‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که استفاده از ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نانوذرات نقره به همراه ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم باعث کمترین آسیب به برگ توتون شده و میزان رشد مجدد باکتری را در حد قابل قبولی کاهش داده است. این روش کاربردی نه تنها باعث کاهش سمیت عناصر سنگین می‌شود بلکه باعث می‌شود از مصرف غلظت‌های بالای آنتی بیوتیک طی انتقال ژن اجتناب نماییم. به طور کلی کاربرد نانوذرات به ویژه نانوذرات نقره همیشه حساسیت هایی را در میان دوستداران محیط زیست بوجود آورده است (Hoet *et al*., 2004) ولی به هر حال این سوال مطرح است که آنتی‌بیوتیک‌های دیگر حاصل مصرف انسان و کارخانجات نیز حتی به شکل گسترده‌تری به محیط زیست آسیب وارد می‌کنند. مطالعه برهمکنش بین نانوذرات نقره و بسیاری از مولکول‌های زیستی در طبیعت آشکار نیست و نیازمند مطالعات طولانی مدت برای شناخت بیشتر این ترکیبات و تجمع آنها در سلول‌های زنده است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و دانشگاه شیراز برای ارائه خدمات و تجهیزات سپاسگزاری می کنند. منابع مالی این طرح به وسیله دانشگاه گرگان و منابع مالی مربوط به تصاویر میکروسکوپ الکترونی با حمایت مالی دانشگاه شیراز و پروفسور حسن صالحی فراهم شده است. این مقاله مستخرج از طرح داخلی مصوب به شماره ۵۱-۳۹۳-۹۷ و گرنت مصطفی خوشحال سرمست در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان می باشد.

منابع

Abdi, Gh., 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.

Aghdaei, M., Salehi, H., Sarmast, M. (2012) Effects of silver nanoparticles on Tecomella undulata (Roxb·) Seem, micropropagation. Advances in Horticultural Science 2: 21-24

Arora, S., Jain, J., Rajwade, J.M., Paknikar, K.M. (2008) Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies. Toxicology Letters, 179: 93–100.

Batarseh, K.I. (2004) Anomaly and correlation of killing in the therapeutic properties of silver (I) chelating with glutamic and tartaric acids. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 54: 546–548.

Benelli, G. (2016) Plant-mediated synthesis of nanoparticles: A newer and safer tool against mosquito-borne diseases? Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 6: 353–354.

Bragg, P.D and Rannie D J. (1974). The effect of silver ions on the respiratory chain of E. coli. Canadian Journal of Microbiology, 20: 883–889.

Braydich-Stolle, L., Hussain, S., Schlager, J.J., Hofmann, M-C. (2005) In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. Toxicological sciences, 88:412-419

da Silva, J.A.T., Nhut, D.T., Tanaka, M., Fukai, S. (2003) The effect of antibiotics on the in vitro growth response of chrysanthemum and tobacco stem transverse thin cell layers (tTCLs). Scientia Horticulturae, 97:397-410

Dodds, J., Roberts, L. (1981) Some inhibitory effects of gentamicin on plant tissue cultures. In Vitro 17(6):467-470

Duygu, D.Y., Erkaya, A., Yalcin, B.M. (2019) Characterization of silver nanoparticle produced by Pseudopediastrum boryanum (Turpin) E. Hegewald and its antimicrobial effects on some pathogens. Inter. Env. Sci. Tech. 1-10. doi.org/10.1007/s13762-019-02315-5.

Falkiner, F. (1990) The criteria for choosing an antibiotic for control of bacteria in plant tissue culture. Int. Soc. Plants tiss. Newsletter 60:13-23.

Gupta, S.D., Agarwal, A., Pradhan, S. (2018) Phytostimulatory effect of silver nanoparticles (AgNPs) on rice seedling growth: An insight from antioxidative enzyme activities and gene expression patterns. Ecotoxicology and Environmental Safety, 161: 624–633.

Hoet, P.H., Brüske-Hohlfeld, I., Salata, O.V. (2004) Nanoparticles–known and unknown health risks. Journal of nanobiotechnology, 2(1):12

Klasen, H.J. (2000) Historical review of the use of silver in the treatment of burns. I. Early uses. Burns, 26: 117–130.

Kumari, A., Vemula, P.K., Ajayan, P.M., John, G. (2008) Silver-nanoparticle-embedded antimicrobial paints based on vegetable oil. Nature Materials, 7: 236–241.

Leifert, C., Waites, B., Keetley, J.W., Wright, S.M., Nicholas, J.R., Waites, W.M. (2000) Effect of medium acidification on filamentous fungi, yeasts and bacterial contaminants in Delphinium tissue cultures. Plant Cell, T issue and Organ Culture, 42: 149–155.

Leifert, C., Cammota, H., Waites, W.M. (1992) Effect of combinations of antibiotics on micropropagated Clematis, Delphinium, Hosta, Iris and Photinia. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 29: 153–160.

Marshall, J.P. and Schneider, R.P. (1977) Systemic argyria secondary to topical silver nitrate. Archives of Dermatological Research, 133: 1077–1079.

Noshad, A., Igbal, M., Folkers, L., Hetherington, C., Khan, A., Numan, M., Ullah, S. (2019) Antibacterial Effect of Silver Nanoparticles (AgNPs) Synthesized from Trichoderma Harzianum against Clavibacter Michiganensis. Journal of Nanotechnology Research, 58.10-19

Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant 15:473-497.

Ogawa, Y. and Mii, M. (2005) Evaluation of 12 β-lactam antibiotics for AMT through in planta antibacterial activities and phytotoxicities. Plant cell reports, 23:736-743

Parimalan, R., Giridhar, P., Ravishankar, G.A. (2011) Enhanced shoot organogenesis in Bixa orellana L. in the presence of putrescine and silver nitrate. Plant Cell Tissue and Organ Culture 105:285–290.

Sarmast, M.K., Niazi, A., Salehi, H., Abolimoghadam, A. (2015) Silver nanoparticles affect ACS expression in Tecomella undulata in vitro culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 121(1):227-236

Sarmast, M.K., Salehi, H., Khosh-Khuim M. (2011) Nano silver treatment is effective in reducing bacterial contaminations of Araucaria excelsa R. Br. var. glauca explants. Acta Biologica Hungarica 62(4):477-484

Sarmast, M.K. and Salehi, H. (2016). Silver Nanoparticles: An Influential Element in Plant Nanobiotechnology. Molecular Biotechnology, 58:441–449

Selwyn, S., Lacey, R.W., Bakhtiar, M. (1980) The beta-lactam antibiotics: penicillins and cephalosporins in perspective. Hodder and Stoughton

Shrivastava, S., Bera, T., Roy, A., Singh, G., Ramachandrarao, P., Dash, D. (2007) Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. Nanotechnology 18(22):225103

Stange, C., Prehn, D., Arce-Johnson, P. (1998). Isolation of Pinus radiate genomic DNA suitable for RAPD analysis. Plant Molecular Biology Reporter, 16: 1–8.

Teixeira da Silva, G.A., Duong, T., Michi, T., Seiichi, F. (2003). The effect of antibiotics on the in vitro growth response of chrysanthemum and tobacco stem transverse thin cell layers (tTCLs). Scientia Horticulturae, 97, 397–410.

Thomas, A. and Broadbridge, R. (1972) The nature of carbenicillin resistance in Pseudomonas aeruginosa. Microbiology 70(2):231-241

Tortella, G., Navas, M., Parada, M., Duran, N., Seabra, AB., Hoffmann N. (2019) Synthesis of Silver Nanoparticles Using Extract of Weeds and Optimized by Response Surface Methodology to the Control of Soil Pathogenic Bacteria Ralstonia solanacearum. Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 19:148-156.

Wang, C., Wang, L., Wang, Y., Liang, Y., Zhang, J. (2012) Toxicity effects of four typical nanomaterials on the growth of Escherichia coli, Bacillus subtilis and Agrobacterium tumefaciens. Environmental Earth Sciences 65(6):1643-1649

Wang, F., Cui, X., Sun, Y., Dong, C-H. (2013a) Ethylene signaling and regulation in plant growth and stress responses. Plant cell reports 32(7):1099-1109

Wang, J., Koo, Y., Alexander, A., Yang, Y., Westerhof, S., Zhang, Q., Schnoor, J.L., Colvin, V.L., Braam, J., Alvarez, P.J. (2013b) Phytostimulation of poplars and Arabidopsis exposed to silver nanoparticles and Ag+ at sublethal concentrations. Environmental science & technology 47(10):5442-5449

Wijnhoven, S.W.P., Peijnenburg, W.J.G., Herberts, C.A., Hagens., W.I., Oomen, A.G., Heugens, E.H.W., (2009) Nano-silver -a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. Nanotoxicology, 3:109-138.

Inhibitory effects and mechanism of Silver nanoparticles in control of *Agrobacterium rhizogenes* growth after co-cultivation and genetic transformation in Tobacco

M. K. Sarmast[1*], H. Salehi[2]

Received:2020.1.22
Accepted:2020.9.6

Abstract

Potential influence of AgNPs on plant genetic transformation through Agrobacterium has not yet been addressed. Here we showed that the growth of Agrobacterium was suppressed in 10 µg/ml AgNPs but controlling the overgrowth of these bacteria would effectively necessitate a higher concentration of AgNPs when tobacco explants have inoculated with *A. Rhizogenes*. Research results indicated that applying more than 150 µg/ml AgNPs and more, resulted in leaf injury and application of 100 µg/ml of AgNPs was unable to suppress bacteria regrowth after co-cultivation with tobacco leaves. The concurrent application of the AgNPs and Cefotaxime with different concentrations were investigated. The results indicated that using 100 µg/ml of AgNPs along with 200 mg/l of cefotaxime lead to the lowest leaf injury and the highest regeneration potential. This application not only caused a reduction in heavy metal toxicity but also decreased excess concentrations of antibiotics during the course of transformation. TEM manifested that the AgNPs could suppress Agrobacterium growth by potentially anchoring to and penetrating the bacterial cell wall. Our results show that the simultaneous use of AgNPs along with Cefotaxime can suppress the overgrowth of *Agrobacterium* during plant transformation. The results of this experiment can open a new window for application of AgNPs with lower diameter in order to suppress bacteria overgrowth.

Keywords: ***Agrobacterium rhizogenes*, Electron Microscopy, Genetic engineering, Tobacco.**

1- Assistant Professor of Department of Horticultural Science, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources (GUASNR), Gorgan, Golestan, Iran
*(Corresponding author: mkhsarmast@gau.ac.ir)
2-Assistant Professor of Department of Horticultural Science, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran