دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۵، شماره ۱، صفحه ۶۷-۵۴ (۱۳۹۸)

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijmapr.2019.116211.2188
شناسه دیجیتال (DOR): 98.1000/1735-0905.1398.35.54.93.1.1575.1610

ارزیابی تأثیر نانو ذرات سبز اکسید مس (CuO) بر مهار قارچ *Botrytis cinerea* عامل بیماری کپک خاکستری گوجه‌فرنگی

سیما کاظمیان[۱]، وحید زرین‌نیا[۲*]، محمود خسروشاهلی[۳] و نادر حسن‌زاده[۴]

۱- کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲*- نویسنده مسئول، استادیار، گروه گیاهپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

پست الکترونیک: zarrinnia@gmail.com

۳- استاد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۴- دانشیار، گروه گیاهپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۶ تاریخ اصلاح نهایی: آبان ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۷

چکیده

قارچ *Botrytis cinerea* از مهمترین بیمارگرهای گوجه‌فرنگی و عامل بیماری کپک خاکستری است. امروزه استفاده از نانوذرات برای مهار بیماری‌های گیاهی مورد توجه ویژه قرار گرفته است. در این پژوهش، تأثیر نانو ذره اکسید مس بیوسنتز شده توسط گیاه اکالیپتوس بر مهار رشد قارچ *B. cinerea*، طی سه آزمایش بررسی شد. در آزمایش اول اثر غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ قسمت در میلیون و در آزمایش دوم اثر غلظت‌های ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۲۰۰ قسمت در میلیون نانوذرات اکسید مس بر شدت بیماری کپک خاکستری در شرایط گلخانه‌ای بررسی شد. در آزمایش سوم اثر غلظت‌های ۴۰۰، ۶۰۰ و ۸۰۰ قسمت در میلیون نانوذرات اکسید مس بر شدت بیماری کپک خاکستری روی برگ‌های بریده مورد تحقیق قرار گرفت. نتایج هر سه آزمایش بیانگر آن بود که نخست نانوذرات اکسید مس قادر به کنترل رشد قارچ *B. cinerea* و بیماری کپک خاکستری در شرایط درون شیشه و درون زیوه هستند. درثانی در هر سه آزمایش بین میزان غلظت نانو ذرات اکسید مس و میزان بازدارندگی از رشد قارچ و کنترل بیماری یک رابطه معکوس و معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ ($P\leq1\%$) وجود دارد. به گونه‌ای که در شرایط درون شیشه غلظت‌های ۴۰۰ و ۶۰۰ قسمت در میلیون و در شرایط درون زیوه شامل آزمایش‌های گلخانه‌ای غلظت‌های ۸۰۰ و ۱۲۰۰ قسمت در میلیون و در آزمون برگ‌های بریده به‌ترتیب غلظت‌های ۶۰۰ و ۸۰۰ قسمت در میلیون نانو ذرات مؤثرترین غلظت‌ها در کنترل قارچ و بیماری حاصل از آن بودند. بر این اساس با افزایش غلظت نانو ذرات اکسید مس میزان رشد کلنی قارچ کمتر و میزان شدت بیماری نیز کاهش یافت. در نهایت نتایج نشانگر آن بود که نانوذرات اکسید مس بر مهار قارچ *B. cinerea* و میزان گسترش بیماری کپک خاکستری حاصل از این قارچ مؤثر است و کاربرد آن توصیه می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: نانو ذره سبز اکسید مس، *Botrytis cinerea*، گوجه‌فرنگی، کپک خاکستری.

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

میوه‌ها و سبزیجات تازه، از آغاز تاریخ بخشی از رژیم غذایی بشر بوده‌اند و اهمیت کامل غذایی آنها در سال‌های اخیر به‌طور کامل مشخص شده است (راحمی، ۱۳۸۴). گوجه‌فرنگی یکی از سبزیجات اصلی است که در بیشتر کشورهای دنیا در زمین‌های زراعی و گلخانه‌ها کشت می‌شود. تولید گوجه‌فرنگی طی ۳۲ سال گذشته به سرعت توسعه یافته است (Bhatia *et al*., 2004). امروزه گوجه‌فرنگی جزء سبزیجات مهم در رژیم غذایی انسان است و علت اهمیت آن وجود انواع ویتامین ها ازجمله ویتامین C، ویتامین‌های گروه B، و کاروتن (پیش‌ساز ویتامین A) و املاح معدنی مانند پتاسیم، آهن، فسفر و کلسیم است که به مقادیر زیاد در آن یافت می‌شود (قشم و کافی، ۱۳۷۸).

مزارع و گلخانه‌های گوجه فرنگی ممکن است در معرض عوامل بیماری‌زای زنده (قارچ‌ها، باکتری‌ها، ویروس‌ها، نماتدها، فیتوپلاسماها و گیاهان انگل گلدار) یا غیر زنده قرار گرفته و با توجه به شرایط محیطی مختلف و نوع رقم، دچار کاهش محصول یا کاهش بازارپسندی میوه شوند. از مهمترین بیماری‌های قارچی گوجه‌فرنگی می توان به بیماری کپک خاکستری با عامل *Botrytis cinerea* اشاره نمود. شبه جنس (tel) *Botryotinia fukelinia*، *Botrytis cinerea* متعلق به شاخه آسکومیکوتا است. تاکنون برای این شبه جنس ۲۲ شبه گونه شناسایی شده‌است. این گونه‌ها براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی، شکل و اندازه کنیدیوم‌ها، اندازه اسکلروت‌ها، مشخصات پرگنه در پتری و دامنه میزبانی تفکیک شده‌اند (Chilvers & du Toit, 2006). این قارچ در شرایط نامساعد تولید اسکلروت می‌کند که عامل مهمی در بقای آن محسوب می‌شود. گونه‌های *Botrytis* spp. ازجمله *B. cinerea* از مهمترین بیمارگرهای گیاهان گلخانه‌ای، سبزی و صیفی، گیاهان زینتی و محصولات زراعی و باغی در مرحله قبل و بعد از برداشت می‌باشند. قارچ *B. cinerea* به‌تنهایی ۲۳۵ گونه گیاهی متعلق به خانواده‌های مختلف را آلوده می کند. بیماری کپک خاکستری می تواند تمام اندام‌های هوایی گوجه‌فرنگی (ساقه، برگ، گل و میوه) را آلوده کند. این قارچ معمولاً از طریق زخم‌های روی ساقه یا محل افتادن برگ‌ها وارد بافت‌های گیاهی می شود و باعث ایجاد شانکر روی ساقه می‌گردد که این شانکرها می توانند به‌صورت حلقه‌ای ساقه را احاطه کنند و باعث پژمردگی کامل گیاه در قسمت‌های بالایی شوند. این قارچ می‌تواند از طریق گلبرگ‌های آلوده به داخل کاسبرگ‌ها و از آنجا به درون میوه نفوذ کند. پیدایش هاله‌های دوار روی میوه‌ها یکی از علائم این بیماری است (Hua *et al*., 2018). علائم روی برگ‌ها به‌صورت لکه‌های کوچک زرد تا قهوه‌ای دیده می شوند، سپس لکه ها خاکستری تا قهوه‌ای شده و به‌سمت دمبرگ گسترش می‌یابد. زخم‌های روی ساقه تیره آفتاب سوخته و یک حاشیه مشخص دارند. روی این زخم‌ها در شرایط خنک و مرطوب توده‌های کپک کرکی خاکستری ایجاد می‌شود (Myresiotis *et al*., 2007). کنترل بیماری کپک خاکستری روی گوجه فرنگی در مرحله پس از برداشت مشکل است، زیرا روش‌های مناسب برای کنترل این بیمارگر در طول دوره انبارداری وجود ندارد. به همین دلیل بیشتر تلاش می شود با اجرای صحیح روش‌های مدیریتی از توسعه این بیماری در مزرعه و گلخانه جلوگیری شود. فناوری نانو، گسترش، تولید و استفاده از ابزار و موادی است که ابعادشان در حدود ۱۰۰-۱ نانومتر می‌باشد. نانوذرات از ده‌ها یا صدها اتم یا مولکول و با اندازه‌ها و خصوصیات ریختی مختلف (آمورف، کریستالی، کروی شکل، سوزنی شکل و غیره) ساخته شده است. فناوری نانو در واقع بر محدودیت اندازه مواد غلبه کرده و توانسته چشم‌انداز جهان را در مورد علم تغییر دهد (Droby *et al*., 2004). مواد نانو به‌عنوان عوامل ضدمیکروبی جدید به‌وجود آمده‌اند، زیرا نسبت سطح به حجم بالا و خواص فیزیکی و شیمیایی منحصر به‌فردشان، تماس آنها را با میکروب‌ها افزایش می‌دهد (Kim *et al*., 2007). اخیراً فعالیت‌های ضدمیکروبی نانوموادی از قبیل نقره (Kumar *et al*., 2008)، مس (Cioffi *et al*., 2005)، تیتانیوم دی‌اکسید (Kwak *et al*., 2001) و اکسید روی (Liu *et al*., 2009) به اثبات رسیده است. اثرهای

Archive of SID

www.SID.ir

ضدمیکروبی نانوذرات بر روی قارچها، باکتریها و ویروس‌ها به خوبی مورد توجه و مطالعه قرار گرفته است. Lamsal و همکاران (۲۰۱۱) با استفاده از عصاره برگ‌های گیاه *Lepisanthe tetraphylla* نانوذراتی با حدود اندازه ۹۰-۲۰ نانومتر تولید کرده‌اند و بعد اثر نانوذرات تولید شده را بر عوامل بیماری‌زای انسانی بررسی کردند. با بررسی گونه‌های *Staphylococcus aureus*، *Escherichia coli*، *Pseudomonas aeruginosa* و *Acinetobacter* دریافتند که نانوذرات تولیدی می‌توانند فعالیتی مشابه مواد ضدمیکروبی شیمیایی داشته باشند بدون آنکه اثر منفی بر بدن انسان باقی بگذارند (Laurance *et al*., 2001). در طی این سالها تحقیقات متعدد و نتایج مشابه بدست آمد. به‌عنوان مثال، فعالیت ضدباکتری نانوذرات اکسید مس با اندازه ۶۰ تا ۱۸۰ نانومتر بر روی رایزوباکتری‌های *Klebsiella pneumonia*، *Pseudomonas aeruginosa* و *Salmonella paratyphi* مشاهده شد (Mahapatra & Khan, 2007). همچنین نانوذرات مس، قادر به مهار میکروارگانیسم‌های دیگری مانند *Saccharomyces cerevisie*، *E. coli*، *Staphylococcus aureus* و *Listeria* spp. شدند (Cioffi *et al*., 2005). سازوکار عمل نانوذرات حاوی مس واکنش با پروکسیدهای موجود در طبیعت و تولید رادیکال‌های آزاد است که برای میکروارگانیسم‌ها بسیار سمّی هستند (Ingle *et al*., 2008). بررسی اثر مس و نانو مس بر جوانه‌زنی بذر فلفل نشان داد که سولفات مس در دو غلظت رشد و جوانه‌زنی را کاهش داده و با افزایش غلظت روند کاهش روبه افزایش گذاشته است. از سوی دیگر، نانو مس در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر روی بیشتر ویژگی‌های رشد تأثیر مثبت داشته و منجر به افزایش درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی و طول گیاهچه های فلفل شده است (Afifipur & Haghighi, 2011). بررسی فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات نقره، اکسید روی و طلا بر روی باکتری *Streptococcus mutans* نشان داد که نانوذرات نقره بیشترین میزان کنترل را داشته است (Holister *et al*., 2003). به همین ترتیب اثر نانوذرات نقره بر روی باکتری گرم منفی *Escherichia coli* و باکتری گرم مثبت *Staphylococcus aureus* مورد بررسی قرار گرفت (Feng *et al*., 2000؛ Ingle *et al*., 2008) و مشاهده شد که نانوذرات نقره با اندازه میانگین ۱۶ نانومتر و در غلظت پایین ۶۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر برای باکتری *E. coli* کاملاً مضر می‌باشد (Mishra & Kumar, 2009). فعالیت ضدقارچی نانوذرات نقره در غلظت بسیار پایین علیه مخمر *Candida albicans* مؤثر بود (Panacek *et al*., 2009).

با توجه به تأثیر نامطلوب سموم شیمیایی بر روی محیط‌زیست همانند تأثیر مخرب بقایای سموم و ریسک‌پذیری بالای استفاده از این ترکیب ها برای کنترل بیماری‌های پس از برداشت و نیز با توجه به مقرون به صرفه بودن تولید نانوذرات و امکان کاربرد آنها در شرایط پس از برداشت، این تحقیق با هدف تولید نانوذرات اکسید مس با پایه گیاهی برای کنترل مؤثر بیماری کپک خاکستری ناشی از قارچ *B. cinerea* در گیاه گوجه‌فرنگی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه قارچ عامل بیماری

جدایه‌های قارچ *B. cinerea* از کلکسیون قارچ‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران تهیه شد. این جدایه قبلاً با روش‌های مورفولوژیکی و مولکولی مورد شناسایی قرار گرفته بود. آزمون اثبات بیماری‌زایی این جدایه برای بررسی توان بیماری‌زایی آنها روی بوته‌های گوجه‌فرنگی رقم سوپر استرین B در مرحله هشت هفته‌ای و میوه گوجه‌فرنگی با سوسپانسیون اسپوری ۱×۱۰^{۵} اسپور بر میلی‌لیتر انجام و در نهایت اصول کُخ مورد بررسی قرار گرفت.

تهیه عصاره گیاهی

برای عصاره‌گیری از برگ‌های تازه گیاه اکالیپتوس (*Eucalyptus* sp.) استفاده گردید. برگ‌ها با استفاده از آب

Archive of SID
www.SID.ir

مقطر شست‌وشو و در دمای محیط خشک شده و بعد عصاره آبی گیاه با استفاده از روش جوشاندن در حلال آب استخراج گردید. عصاره آبی استخراج شده با استفاده از فیلتر صاف شده و عصاره گیاه تا زمان مصرف در شرایط تاریکی و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Azwanida, 2015).

سنتز و تأیید نانوذرات سبز اکسید مس

برای این منظور ابتدا محلول ۰/۰۰۱ مولار از سولفات مس ($CuSO_4$) تهیه و روی هیتر قرار داده شد. در مرحله بعد عصاره اکالیپتوس به نسبت (۱:۱۰) به محلول سولفات مس به‌صورت قطره قطره اضافه و اجازه داده شد تا دما به ۸۰-۷۰ درجه سانتی‌گراد به آرامی افزایش یابد. بعد از آن محلول به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه گردید. در طول مدت انکوباسیون با احیاء مس فلزی، رنگ محلول به مرور به قهوه‌ای تیره مایل به سبز تغییر یافت، این تغییر رنگ نشان‌دهنده احیاء یون فلزی اکسید مس به نانوذرات پایدار است. به‌منظور بررسی خاصیت کریستالی، ساختار و اندازه کریستال‌های نانوذرات اکسید مس از تکنیک XRD با استفاده از Rigaku-Miniflex X-ray diffract meter (Rigaku Corporation, Tokyo, Japan) با تابش Cu-Kα (λ=0.15406 nm) در گستره 2θ از ۲۰ تا ۸۰ درجه استفاده شد. برای مشاهده خصوصیات ریخت‌شناسی نانوذرات تولید شده و اندازه آنها از میکروسکوپ الکترونیک روبشی (Scaning Electron Microscopy :SEM) به‌وسیله سیستم (JEOL JSM5600) مدل EM3200 شرکت KYKY ساخت کشور چین استفاده گردید (Taghavi Fardood & Ramezani, 2016).

اثر ضد قارچی نانو ذرات سنتز شده در شرایط آزمایشگاهی

اثر ضد قارچی نانو ذرات مس سنتز شده روی قارچ *B. cinerea* به روش اختلاط نانو ذرات اکسید مس سنتز شده با محیط کشت مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ قسمت در میلیون نانو ذرات اکسید مس به ارلن‌های حاوی محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA: Potato Dextrose Agar) اضافه و هم‌زده شد تا امولسیون یکنواخت حاصل شود. ۱۵ CC از محیط‌های کشت مذکور بلافاصله درون ظروف پتری به قطر ۹ سانتی‌متر تقسیم و اجازه داده شد تا محیط ببندد. سپس یک دیسک قارچی در قسمت مرکزی ظرف پتری حاوی محیط کشت قرار داده شد. ظروف پتری در شرایط دمایی ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. قطر قارچ به‌طور روزانه اندازه‌گیری و ثبت شد و این کار تا رشد کامل قارچ در ظرف پتری شاهد ادامه یافت. درصد بازدارندگی غلظت های مختلف نانو ذرات مس سنتز شده با بهره‌گیری از فرمول ابوت (Abbott, 1925) تعیین شد.

$$\text{درصد بازدارندگی نانو ذره} = \frac{\text{قطر کلنی تیمار} - \text{قطر کلنی شاهد}}{\text{قطر کلنی شاهد}} \times 100$$

MIC (Minimum Inhibitory Concentration)، حداقل غلظت مهارکننده از رشد قارچ یا حداقل غلظت بازدارندگی و MFC (Minimum Fungicide Concentration)، حداقل غلظت قارچ‌کشی تعیین شد. حداقل غلظتی که در آن ۱۰۰٪ بازدارندگی رشد قارچ مشاهده شد به‌عنوان حداقل غلظت بازدارندگی تعیین شد. همچنین به‌منظور تعیین حداقل غلظت کشندگی، دیسک‌های قارچی از غلظت‌هایی که در آنها ۱۰۰٪ بازدارندگی مشاهده

Archive of SID

www.SID.ir

شده بود خارج و به محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA) منتقل گردیدند. چنانچه قارچ‌ها در این محیط رشد نمی‌کردند غلظتی که قارچ از آن جدا شده بود به‌عنوان حداقل غلظت قارچ‌کشی مورد توجه قرار گرفت (Sobhani *et al.*, 2014).

ارزیابی تأثیر نانو ذرات اکسید مس بر مهار کپک خاکستری در شرایط گلخانه روی گیاهچه

به‌منظور ارزیابی تأثیر نانو ذرات اکسید مس بر افزایش سطح مقاومت گوجه‌فرنگی نسبت به بیماری کپک خاکستری، گیاه گوجه‌فرنگی در گلخانه تا مرحله پنج برگی کشت داده شد و اثر غلظت‌های ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۲۰۰ قسمت در میلیون بر مهار عامل بیماری مورد بررسی قرار گرفت. برای هر غلظت مورد مطالعه ۳ تکرار در نظر گرفته شد و هر تکرار شامل پنج گیاه بود. آب مقطر سترون نیز به‌عنوان شاهد منفی و سوسپاسیون اسپوری بدون تیمار نانوذره به‌عنوان شاهد مثبت در نظر گرفته شد. به‌منظور انجام آزمایش، گیاهان ابتدا با غلظت‌های ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۲۰۰ قسمت در میلیون نانوذره تلقیح شده، آنگاه بعد از گذشت ۱۲ ساعت با سوسپانسیون اسپوری از قارچ *B. cinerea* به غلظت ۴×۱۰^{۶} اسپور بر میلی‌لیتر روی گیاه تلقیح شدند و اسپورپاشی به گونه‌ای انجام شد که سوسپانسیون اسپوری به‌طور کامل روی سطح گیاه را پوشش دهد. ارزیابی شدت بیماری با مقیاس صفر تا پنج مطابق با روش Saligkarias و همکاران (۲۰۰۲) هفت روز پس از تلقیح انجام شد (جدول ۱).

ارزیابی تأثیر نانو ذرات اکسید مس بر مهار کپک خاکستری روی برگ بریده

برای بررسی تأثیر نانو ذرات اکسید مس بر مهار کپک خاکستری روی برگ بریده، سه غلظت ۴۰۰، ۶۰۰ و ۸۰۰ قسمت در میلیون از نانوذرات اکسید مس روی برگ‌های بریده سترون شده محلول‌پاشی شد و ۶ ساعت بعد سوسپانسیون اسپور با غلظت ۴×۱۰^{۶} اسپور بر میلی‌لیتر روی برگ‌ها لکه‌گذاری شد. به‌منظور سترون‌سازی برگ‌ها از هیپوکلریت سدیم ۳٪ استفاده شد. برای این منظور برگ‌ها برای مدت ۱ دقیقه در این محلول قرار گرفته و پس از سه مرتبه شست‌وشو با آب مقطر استریل خشک شده و بعد برای آزمون بیماری‌زایی مورد استفاده قرار گرفتند. ارزیابی شدت بیماری نیز از طریق اندازه‌گیری قطر لکه نکروز حاصل از بیماری تا هفت روز پس از تلقیح به‌صورت روزانه انجام گردید.

جدول ۱- مقیاس‌های بکار رفته در ارزیابی شدت بیماری در آزمون گلخانه‌ای

شاخص	شدت بیماری توصیف شده
۰	بدون زخم یا لکه
۱	زخم یا لکه‌هایی به قطر ۲-۱ میلی‌متر
۲	زخم یا لکه‌هایی به قطر ۱۰-۲ میلی‌متر یا ۲۵٪ سطح بافت آلوده باشد
۳	زخم یا لکه‌هایی به قطر ۲۰-۱۰ میلی‌متر یا ۵۰٪ سطح بافت آلوده باشد
۴	زخم یا لکه‌هایی به قطر بیشتر از ۲۰ میلی‌متر یا ۷۵٪ سطح بافت آلوده باشد
۵	آلودگی کل بافت

طرح آزمایشی و تجزیه‌وتحلیل داده‌ها

تمامی آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS 9.1 تجزیه آماری شده و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱٪ ($P\leq1\%$) انجام شد. نرمال بودن تمام داده ها قبل از انجام بررسی‌های آماری توسط نرم‌افزار Minitab 14 مورد بررسی قرار گرفت.

Archive of SID
www.SID.ir

نتایج

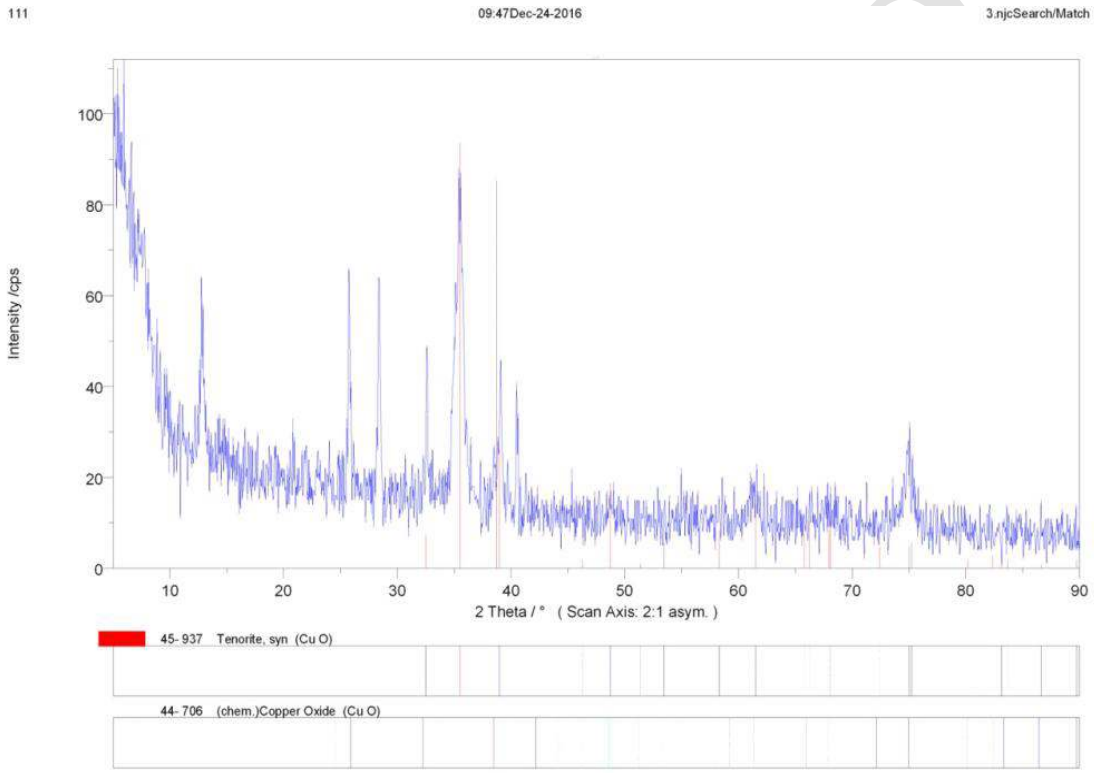
ارزیابی نانوذرات اکسید مس سنتز شده

الف) نتیجه بررسی نانوذرات سنتز شده به‌وسیله روش پراش پرتو-X (X-ray diffraction :XRD)

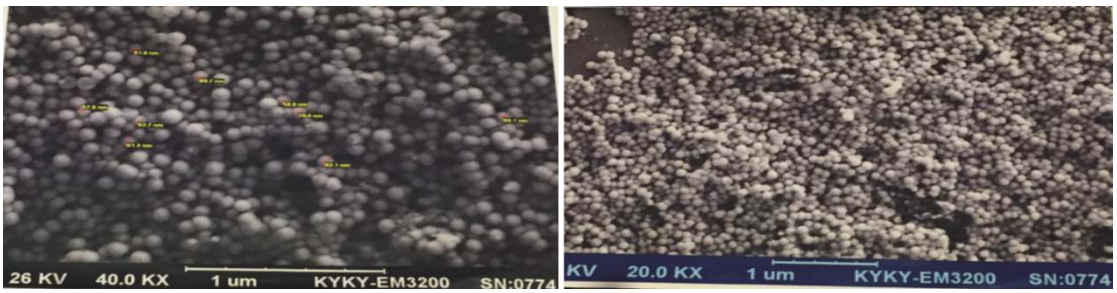
به‌منظور بررسی خلوص نانوذرات تولید شده طیف پراش پرتو-X (XRD) مورد بررسی قرار گرفت. پرتو طیف XRD تشکیل نانوذرات اکسید مس تک مرحله را مورد تأیید قرار داد (شکل ۱).

ب) نتیجه میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

نتایج میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، نتایج حاصل از طیف‌سنجی با پرتو-X را تأیید کرد. میانگین اندازه ذرات بیوسنتز شده برابر با ۷۰-۵۰ نانومتر بود. تصاویر میکروسکوپ الکترونی این نانوذرات در شکل ۲ ارائه شده است.



شکل ۱- طیف پراش پرتو-X (XRD) نانو ذرات اکسید مس (CuO)

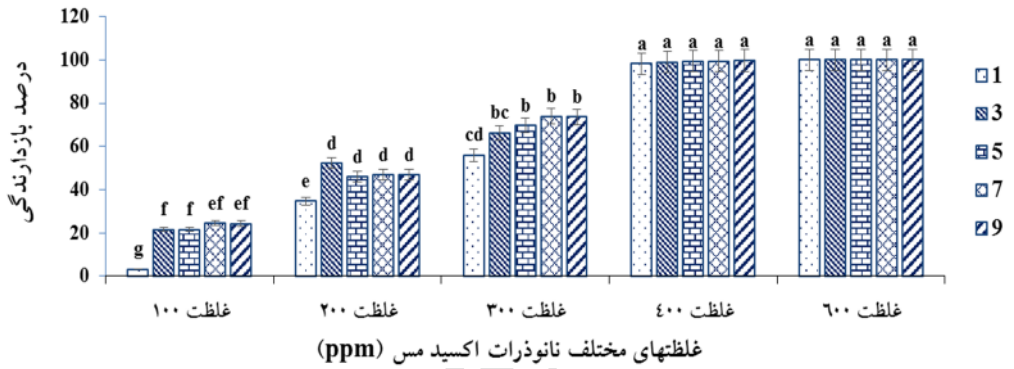


شکل ۲- تصویر میکروسکوپ اسکن الکترونی از نانودرات اکسید مس بیوسنتز شده توسط گیاه اکالیپتوس

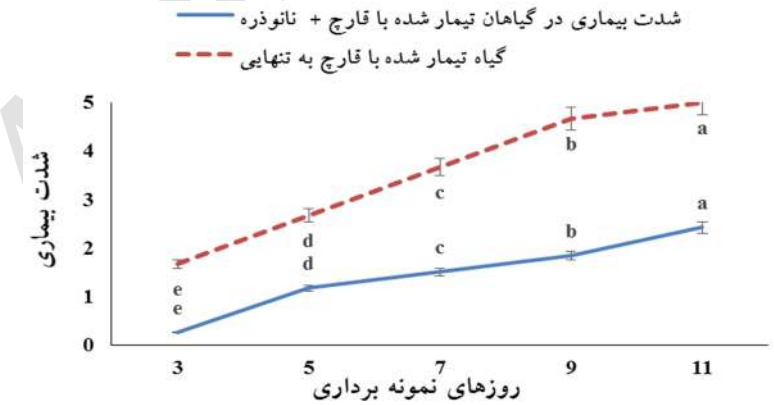
www.SID.ir

بررسی اثر ضد قارچی نانو ذرات بیوسنتز شده در شرایط آزمایشگاهی (in vitro)

بررسی کلی اثر غلظت های مختلف نانو اکسید مس تولید شده توسط گیاه اکالیپتوس بر رشد قارچ *B. cinerea* نشان داد که با افزایش غلظت نانوذرات روند درصد بازدارندگی رو به افزایش گذاشت. ازاین‌رو، تمامی داده‌ها به خوبی نمایانگر این واقعیت هستند که یک رابطه خطی معکوس و معنی دار بین افزایش غلظت نانو ذرات اکسید مس و قطر کلنی قارچ مذکور وجود دارد، به‌عبارت دیگر می‌توان گفت که این اثرها وابسته به مقدار می‌باشند. بر این اساس کمترین درصد بازدارندگی مربوط به غلظت ۱۰۰ قسمت در میلیون نانوذرات برابر ۱۹٪ و غلظت ۶۰۰ و ۴۰۰ قسمت در میلیون نیز ۱۰۰٪ بازدارندگی از رشد را نشان داده و از نظر آماری با یکدیگر اختلاف معنی داری در سطح احتمال ۱٪ نداشتند (شکل ۳). همچنین غلظت ۴۰۰ قسمت در میلیون نانوذرات اکسید مس به‌عنوان حداقل غلظت بازدارندگی و غلظت ۶۰۰ قسمت در میلیون نانوذرات اکسید مس به‌عنوان حداقل غلظت قارچ‌کشی تعیین گردید.



شکل ۳- مقایسه میانگین درصد بازدارندگی غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید مس بر ممانعت از رشد میسلیومی قارچ ***B. cinerea*** در شرایط آزمایشگاهی (***in vitro***)



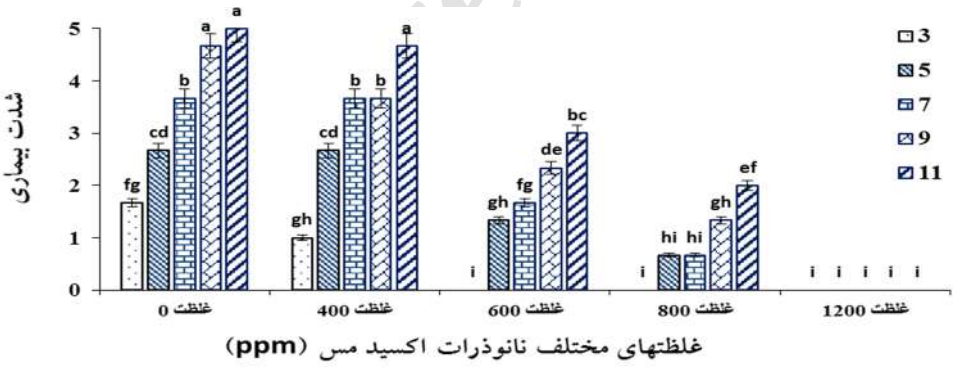
شکل ۴- مقایسه میانگین شدت بیماری در گیاهان تیمار شده با قارچ ***B. cinerea*** در مقایسه با گیاهان تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید مس

www.SID.ir

بررسی اثر ضد قارچی نانو ذرات اکسید مس روی شدت بیماری کپک خاکستری در شرایط درون زیوه (in vivo)

نتایج این بخش از آزمون نشان داد که بین غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید مس، زمان‌های متفاوت نمونه‌برداری و اثر متقابل آنها تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ ($P\leq1\%$) وجود داشت. در تمامی تیمارها، بیشترین شدت بیماری در روز یازدهم بعد از تلقیح مشاهده شد. همچنین در تمامی روزهای مورد بررسی شدت بیماری در گیاهان تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانوذرات نسبت به گیاهان شاهد منفی (گیاهان تیمار شده با قارچ عامل بیماری بدون نانوذرات) در سطح احتمال ۱٪ ($P\leq1\%$) اختلاف معنی‌داری را از خود نشان دادند. به گونه‌ای که از شدت بیماری در گیاهان تیمار شده کاسته شده بود. این امر نشان‌دهنده توان مؤثر نانوذرات اکسید مس در مهار بیماری کپک خاکستری ناشی از قارچ *B. cinerea* می‌باشد (شکل ۴).

به‌علاوه مقایسه غلظت های مختلف نانوذره اکسید مس در کاهش شدت بیماری نشان داد که کمترین شدت بیماری مربوط به غلظت ۱۲۰۰ قسمت نانوذره در میلیون بود که هیچ‌گونه علائمی از بیماری روی گیاه تیمار شده با این غلظت مشاهده نشد و نتیجه آزمایش در این قسمت اختلاف معنی‌داری را در سطح احتمال ۱٪ ($P\leq1\%$) با گیاه سالم نداشت. همچنین غلظت ۴۰۰ قسمت نانوذره در میلیون بیشترین میانگین شدت بیماری را از خود نشان داد. این امر نشان‌دهنده وجود یک رابطه معکوس و معنی‌دار بین میزان غلظت نانوذره و توان کنترل شدت بیماری بود، به گونه ای که شدت بیماری در گیاهان تیمار شده با غلظت‌های پایین‌تر از نظر آماری با شاهد منفی فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ ($P\leq1\%$) بودند. این امر نشان‌دهنده عدم موفقیت این غلظت ها در مهار مناسب بیماری می‌باشد. حال آنکه در غلظت های بالاتر بیماری به خوبی مهار شده و در غلظت ۱۲۰۰ قسمت در میلیون شدت بیماری به صفر رسیده بود (شکل ۵).



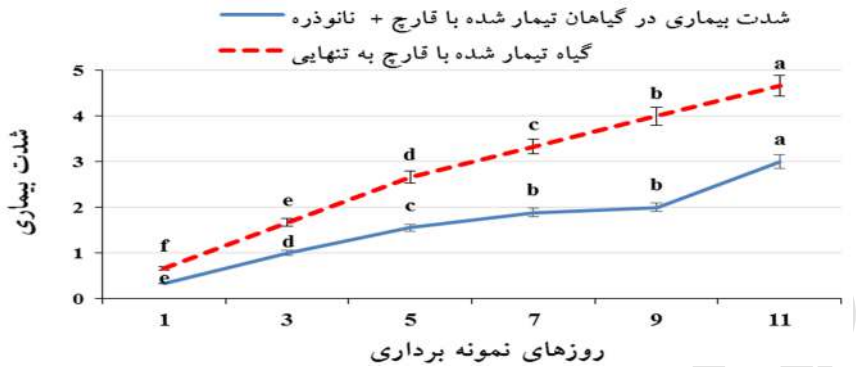
شکل ۵- مقایسه تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید مس بر میانگین شدت بیماری ناشی از قارچ *B. cinerea* در روزهای متفاوت نمونه‌برداری

ارزیابی تأثیر نانوذرات اکسید مس بر مهار بیماری کپک خاکستری روی برگ بریده

بین غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید مس و زمان‌های متفاوت نمونه‌برداری تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ ($P\leq1\%$) وجود داشت. با این حال بین اثر متقابل آنها از نظر آماری تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. در تمامی تیمارها، با افزایش تعداد روزهای بعد از تلقیح میانگین شدت بیماری به مرور افزایش یافت. اگرچه در تمامی روزهای نمونه‌برداری میانگین شدت بیماری در

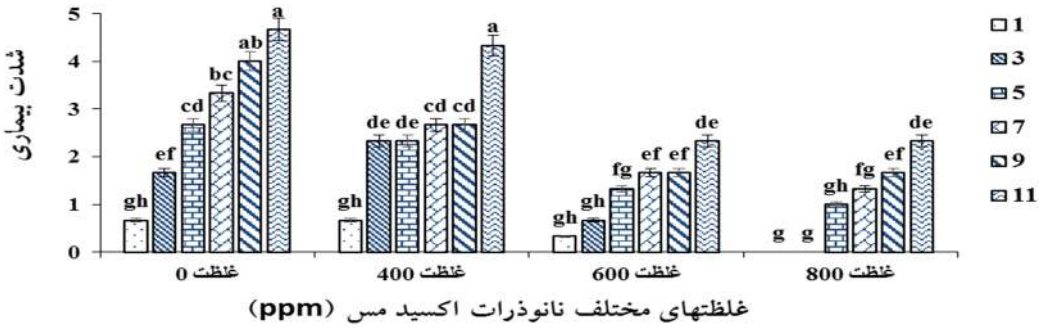
www.SID.ir

گیاهان تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانوذرات نسبت به شاهد مثبت (برگ‌های آلوده شده با قارچ *B. cinerea*) بود، اما اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ ($P\leq1\%$) داشتند؛ به گونه‌ای که میزان شدت بیماری در گیاهان تیمار شده با نانوذرات نسبت به شاهد مثبت دارای میانگین شدت بیماری کمتری بودند (شکل ۶).



شکل ۶- مقایسه میانگین شدت بیماری در قالب گروه‌بندی‌های مجزا برای تیمار و شاهد مثبت (گیاهان تیمار شده با قارچ *B. cinerea*) در روزهای متفاوت نمونه‌برداری طی ۶ دوره ارزیابی شدت بیماری پس از تلقیح

همچنین بررسی‌ها در مورد تأثیر غلظت نانوذرات اکسید مس بر میزان میانگین شدت بیماری نیز بیانگر آن بود که شدت بیماری در برگ‌های تیمار شده با غلظت های پایین‌تر از نظر آماری با شاهد مثبت (گیاهان تیمار شده با قارچ *B. cinerea*) در یک گروه قرار داشته و هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ ($P\leq1\%$) در آنها مشاهده نشد. این امر نشان‌دهنده عدم موفقیت غلظت های پایین در مهار مناسب بیماری می‌باشد. حال آنکه در غلظت های بالاتر بیماری به‌خوبی مهار شده، به‌گونه‌ای که در غلظت ۸۰۰ قسمت در میلیون کمترین شدت بیماری مشاهده گردید. در این غلظت از نانوذرات تا روز سوم هیچ گونه علائمی از بیماری روی برگ‌های تلقیح شده مشاهده نشد ولی بعد از آن علائم با سرعت بسیار پایینی ظاهر شدند؛ به‌نحوی که در روز یازدهم شدت بیماری معادل ۲/۳٪ بود که از نظر آماری با غلظت ۶۰۰ قسمت در میلیون اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ نداشته و هر دو در یک گروه آماری قرار گرفتند. در مجموع نتایج بدست‌آمده در این آزمون با نتایج مربوط به آزمون شرایط آزمایشگاهی (*in vitro*) و گلخانه‌ای (*in vivo*) همسو بود (شکل ۷).



شکل ۷- مقایسه تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید مس روی شدت بیماری ناشی از قارچ *B. cinerea* طی ۶ دوره ارزیابی شدت بیماری پس از تلقیح

Archive of SID
www.SID.ir

بحث

اطلاعات اندکی در مورد فعالیت ضدمیکروبی نانوذرات اکسید مس (CuO) در دسترس است. نانوذرات اکسید مس (CuO) از بسیاری از ترکیب های با فعالیت ضدمیکروبی از قبیل طلا و نقره ارزان‌تر است و به آسانی با پلیمرها مخلوط می‌گردد و از لحاظ فیزیکی و شیمیایی نسبتاً پایدار است (Xu *et al*., 1999). نانوذرات به شدت یونی اکسیدهای فلزی مانند CuO دارای قابلیت لازم برای کاربرد به‌عنوان عوامل ضدمیکروبی می‌باشند و می توانند با ناحیه سطحی بسیار وسیع و مورفولوژی‌های کریستالی مختلفی تهیه شوند (Stoimenov, 2002).

نتایج بدست‌آمده از تأثیر غلظت های مختلف نانوذرات اکسید مس بر رشد پرگنه قارچ در محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA)، در زمان‌های مختلف در این تحقیق نشان داد که بین تیمارها و زمان‌های مختلف تفاوت معنی داری در سطح احتمال ۱٪ ($P\leq1\%$) وجود داشت. اثر کاربرد نانوذرات با بالا رفتن غلظت آنها افزایش یافته است و در غلظت‌های بالاتر این نانو ذرات خاصیت قارچ‌کشی داشتند.

تأثیر نانوذرات اکسیدی در غلظت‌های بالا در نتایج Wani و Shah (۲۰۱۲) که اثر نانوذرات اکسید روی و اکسید منیزیوم را بر روی قارچ‌های *Fusarium oxysporum*، *Rhizopus stolonifer*، *Alternaria alterna* و *Mucor plumbeusta* بررسی کردند، مطابقت داشت. همچنین نتایج بدست آمده در این تحقیق با نتایج کاربرد سیلیکا-نقره در کاهش تولید اسپور قارچ *B. cinerea* مطابقت داشت (Park *et al*., 2006).

Chwalibog و همکاران (۲۰۱۰) نیز بیان کردند که نانوذرات نقره، نانوذرات طلا و نانوپلاتین (نانوذرات فلزی) باعث تخریب باکتری‌ها و قارچ‌ها می شوند. این محققان با استفاده از میکروسکوپ الکترونی تغییرات مورفولوژی حاصل از برهم‌کنش میکروارگانیسم‌ها و نانوذرات را مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که این برهم‌کنش باعث آسیب دیدن سلولهای قارچ می شود. نانوذرات به سطح سلول میکروارگانیسم متصل می شوند و این اتصال باعث تغییرات ساختمانی و آسیب سلول می‌گردد و به‌طور خاص فعالیت‌های حیاتی سلول مانند نفوذپذیری و فعالیت آنزیم‌های زنجیره تنفسی را مختل نموده و در نهایت منجر به مرگ سلول می‌شوند. نانوذرات اکسید مس با آزادسازی یون Cu^{2+} آسیب جدی به DNA وارد می‌کند. همچنین این نانوذرات می توانند با اندام‌هایی مانند میتوکندری برهم‌کنش داشته باشند و فعالیت پروتئین‌های تحریک‌کننده رادیکال‌های اکسیژن آزاد را در سلول‌ها کاهش دهند (Bondarenko *et al*., 2012).

نانوذرات استفاده شده در این بررسی به‌صورت بیولوژیک و توسط گیاه اکالیپتوس بیوسنتز شده بود که در گزارش‌های متعدد کارآیی بالای آن به اثبات رسیده است. Savithramma و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند که نانوذرات نقره تولیدی توسط پوست ساقه *Shorea tumbuggia* (گیاهان بومی هند) بالاترین سطح فعالیت ضدباکتریایی را علیه *Pseudomonas* sp. و *Bacillus* sp. و بیشترین فعالیت ضد قارچی را علیه *Aspergillus* sp. و *Fusarium* sp. و *Rhizopus* sp. داشته است. همچنین نانو ذرات نقره تولیدی توسط گیاه *Svensonia hyderobadensis* بالاترین فعالیت ضدباکتریایی را علیه *E. coli*، *Klebsiella* sp. و *Bacillus* sp. و بالاترین فعالیت ضد قارچی را علیه *Fusarium* sp.، *Rhizopus* sp.، *Aspergillus* sp. و *Curvularia* sp. از خود نشان داده است (Savithramma *et al*., 2011).

اگرچه بررسی‌های آزمایشگاهی روش خوبی برای ارزیابی مقدماتی تأثیر نانوذرات در مهار قارچ می‌باشد، اما براساس نتایج آزمایشگاهی به‌تنهایی نمی‌توان به مفید بودن اثر این نانوذرات و میزان واقعی اثر آنها بر روی قارچ مورد نظر پی برد. زیرا در شرایط آزمایشگاهی میزان اثر این نانوذرات بر روی یک محیط کشت غذایی و در دمای لازم و مناسب برای رشد قارچ بررسی می‌شوند. اما در شرایط گلخانه، عوامل زیادی مانند دما و تغییرات آن، اسیدیته، رطوبت، بافت خاک و رفتار سایر میکروارگانیسم‌ها مؤثر می باشند. از سویی هم با توجه به اینکه از سرنوشت این

Archive of SID
www.SID.ir

نانوذرات پس از وارد شدن به بافت گیاه اطلاعات کاملی در دسترس نیست، انجام آزمایش‌های گلخانه‌ای ضروری می‌باشد. در بررسی‌های گلخانه‌ای نیز همانند بررسی‌های آزمایشگاهی غلظت های بالاتر تأثیر مؤثرتری در مهار بیماری داشتند و به‌خوبی شرایط آزمایشگاهی قادر به مهار بیماری بودند. از آنجایی که در این تحقیق نانوذرات اکسید مس ۱۲ ساعت زودتر از قارچ عامل بیماری روی گیاه تلقیح شدند و همچنین روی برگ بریده هم ۶ ساعت زودتر تلقیح شدند، بنابراین نتایج حکایت از مؤثر بودن کاربرد پیشگیرانه این ترکیب ها در مهار بیماری دارد. به‌عبارتی دیگر، مشاهدات گلخانه‌ای نشان داد که کاربرد این نانوذرات قبل از اینکه قارچ عامل بیماری درون بافت گیاهان نفوذ کرده و بافت‌ها را کلونیزه کند، مؤثرتر می‌باشند. در تحقیقی مشابه Lamsal و همکاران (۲۰۱۱) نانوذرات نقره را بر روی دو قارچ *Golovinomyces cichoracearum* و *Sphaerotheca fusca* عامل سفیدک سطحی در خیار و کدو، در دو حالت قبل و بعد از ظهور بیماری بکار بردند. در پژوهش بالا کاربرد نانوذرات نقره، قبل از ظهور بیماری بسیار مؤثر بود. یافته‌های Lamsal و همکاران (۲۰۱۱) حکایت از نقش مؤثرتر پیشگیری در مقایسه با کاربرد بعد از آلوده‌سازی گیاه داشته است که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد.

در این تحقیق اثر نانوذرات بیوسنتز شده با گیاه که سایز نانومتری داشتند در مهار شدت بیماری مؤثر واقع شده است که طبق گفته‌های Liu و همکاران (۲۰۰۹) اندازه، مورفولوژی و غلظت ذرات در فعالیت ضدمیکروبی نانوذرات بسیار تعیین کننده می‌باشد. البته هرچه اندازه ذرات کوچکتر باشد (۱۵ تا ۹۰ نانومتر) اثر ضدمیکروبی نانوذرات به‌دلیل افزایش سطح به حجم بیشتر شده و هرچه شکل منظم‌تر و غلظت بالاتر باشد درجه تأثیرگذاری آنها بالاتر می‌باشد. محققان بسیاری تأثیر نانوذرات سنتز شده طبیعی یا بیولوژیک را با نانوذرات شیمیایی مقایسه کرده‌اند و به این نتیجه رسیده‌اند که تأثیرگذاری نانوذرات بیولوژیک در مهار بیماری های گیاهی بالاتر از نانوذرات شیمیایی است. Joerger و همکاران (۲۰۰۰) گزارش کردند که نانوذرات نقره تولید شده توسط برخی قارچ‌ها از پایداری زیادی برخوردار می‌باشند. شاید دلیل آن تثبیت نانوذرات نقره توسط برخی پروتئین‌ها باشد.

در سال های اخیر با کشف فناوری نانو، امیدهای فراوانی برای کم کردن مصرف مواد شیمیایی و داشتن محیطی سالم‌تر و انسانی شاداب‌تر بوجود آمد. در این زمینه پژوهش‌های فراوانی در دنیا در حال انجام است. مواد نانو به‌عنوان عوامل ضدمیکروبی جدید بوجود آمده‌اند. زیرا نسبت سطح به حجم بالا و خواص فیزیکی و شیمیایی منحصر به فرد آنها تماس با سطح سلولی میکروب‌ها را افزایش داده و کارایی آنها را برای نفوذ به سلول افزایش می‌دهد. همچنین از آنجایی‌که نانوذرات، پلی بین حالت حجیم ماده و حالت اتمی یا مولکولی هستند، مورد توجه قرار گرفته‌اند. نانوذرات فلزی به‌دلیل خصوصیات جالب توجه الکتریکی، اپتیکی، شیمیایی و مغناطیسی که از خود نشان داده‌اند، مورد بررسی های فراوان قرار گرفته‌اند. بنابراین نتایج بدست آمده از مجموع آزمایش های گلخانه‌ای و شرایط آزمایشگاهی نشان‌دهنده تأثیر مطلوب نانوذرات اکسید مس در مهار قارچ *B. cinerea* می‌باشد. نتیجه‌گیری مهم دیگر حکایت از این دارد که تأثیرات یا سمّیت نانوذرات اکسید مس وابسته به دوز مصرفی و زمان مصرف آنها در گیاه می‌باشد. در نهایت با توجه به تأثیر مطلوب نانوذرات اکسید مس بر کنترل قارچ *B. cinerea* و بیماری کپک خاکستری ناشی از آن و عدم تأثیر مخرب زیست محیطی این ترکیب، مصرف آن برای مهار بیماری کپک خاکستری روی گیاه گوجه‌فرنگی توصیه می‌شود.

منابع مورد استفاده

- راحمی، م.، ۱۳۸۴. فیزیولوژی پس از برداشت، مقدمه‌ای بر فیزیولوژی و جابه‌جایی میوه، سبزی‌ها و گیاهان زینتی. انتشارات دانشگاه شیراز، ۲۵۹ صفحه.
- قشم، ر. و کافی، م.، ۱۳۷۸. گوجه‌فرنگی صنعتی، از کاشت تا برداشت. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد، ۸۰ صفحه.

Archive of SID
www.SID.ir

cinerea causing post-harvest decay in fruits and vegetables. Food Quality and Safety, 2(3): 111-119.
- Ingle, A., Gade, A., Pierrat, S., Sonnichsen, C. and Rai, M., 2008. Mycosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium acuminatum* and its activity against some human pathogenic bacteria. Current Nanoscience, 4: 141-144.
- Joerger, R., Klaus, T. and Granqvist, C.G., 2000. Biologically produced silver-carbon composite materials for optically functional thin film coatings. Advanced Materials, 12: 407-409.
- 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. and Hwang, C.Y., 2007. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. Nanomedicine, 3: 95-101.
- Kumar, A., Vemula, P.K., Ajayan, P.M. and John, G., 2008. Silver nanoparticle-embedded antimicrobial paints based on vegetable oil. Nature Materials, 7: 236-241.
- Kwak, S.Y., Kim, S.H. and Kim, S.S., 2001. Hybrid organic/inorganic reverse osmosis (RO) membrane for bactericidal antifouling 1 Preparation and characterization of TiO_2 nanoparticle self-assembled aromatic polyamide thin film-composite (TFC) membrane. Environmental Science Technology, 35: 2388-2394.
- Lamsal, K., Kim, S.W. and Jung, J.H., 2011. Effects of Silver nanoparticles against powdery mildews on cucumber and pumpkin. Mycobiology, 39: 26-32.
- Laurance, D.R., Bennett, P.N. and Brown, M.J., 2000. Clinical Pharmacology. Singapore, Longman, 192p.
- Liu, Y., He, L., Mustapha, A., Li, H. and Lin, M., 2009. Antibacterial activities of zinc oxide nanoparticles against *Escherichia coli* O157:H7. Journal of Applied Microbiology, 107: 1193-1201.
- Mahapatra, S.S. and Khan, M.S., 2007. A neural network approach for assessment quality in technical education: an empirical study. International Journal of Productivity and Quality Management, 2(3): 287-306.
- Mishra, V.K. and Kumar, A., 2009. Impact of metal nanoparticles on the plant growth promoting *Rhizobacteria*. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, 3(4): 587-592
- Myresiotis, C.K., Karaoglanidis, G.S. and Tzavella-Klonari, K., 2007. Resistance of *Botrytis cinerea* isolates from vegetable crops to anilinopyrimidine, phenylpyrrole, hydroxyanilide, benzimidazole, and dicarboximide fungicides. Plant Disease, 91: 407-413.
- Panacek, A., Kolar, M., Vecerova, R., Prucek, R., Soukupova, J., Krystof, V., Hamal, P., Zboril, R. and Kvitek, L., 2009. Antifungal activity of silver
- Abbott, W.S., 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. Journal of Economy and Entomology, 18: 265-267.
- Azwanida, N.N., 2015. A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. Medicinal and Aromatic Plants, 4(3): 1-6.
- Afifipur, Z. and Haghighi, M., 2011. Effect of copper and copper nanoparticles on the germination of pepper. Proceeding of the First National Conference on Modern Agricultural Sciences and Technologies, Iran, Zanjan.
- Bhatia, P., Nanjappa, A., Tissa, S. and David, M., 2004. Tissue culture studies of tomato (*Lycopersicon esculentum*). Plant Cell Tissue and Organ Culture, 78: 1-21.
- Bondarenko, O., Ivask, A., Käkinen, A. and Kahru, A., 2012. Sub-toxic effects of CuO nanoparticles on bacteria: Kinetics role of Cu ions and possible mechanisms of action. Environmental Pollution, 169: 81-89.
- Chilvers, M.I. and du Toit, L.J., 2006. Detection and identification of *Botrytis* species associated with neck rot, scape blight, and umbel blight of onion. Plant Health Progress, 7: 1-20, Online.
- Chwalibog, A., Sawosz, E., Hotowy, A., Szeliga, J., Mitura, S., Mitura, K., Grodzik, M., Orlowski, P. and Sokolowska, A., 2010. Visualization of interaction between inorganic nanoparticles and bacteria or fungi. International Journal of Nanomedicine, 6(5): 1085-1094.
- Cioffi, N., Torsi, L., Ditaranto, N., Tantillo, G., Ghibelli, L. and Sabbatini, L., 2005. Copper nanoparticle/polymer composites with antifungal and bacteriostatic properties. Journal of Materials Chemistry, 17: 5255-5262.
- Droby, A. and Lichter, A., 2004. Post-harvest *Botrytis* infection: etiology, development and management: 349-367. In: Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N., (Eds.). *Botrytis*: Biology, Pathology and Control. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Press, 392p.
- Feng, Q.L., Wu, J., Chen, G.O., Cui, F.Z., Kim, T.N. and Kim, J.O., 2000. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Journal of Biomedical Materials Research, 52: 662-668.
- Holister, P., Weener, J.W., Romas Vas, C. and Harper, T., 2003. Nanoparticles: technology white papers 3. Sientific Ltd, 2-11.
- Hua, L., Yong, C., Zhanquan, Z., Boqiang, L., Guozheng, Q. and Shiping, T., 2018. Pathogenic mechanisms and control strategies of *Botrytis*

Archive of SID

www.SID.ir

activity of two plant essence on the qualitative and quantitative characteristics of strawberry fruit during storage condition. International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research, 2(7): 2238-2246.
- Stoimenov, P.K., 2002. Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents. Langmuir, 18(17): 6679-6686.
- Taghavi Fardood, S. and Ramezani, A., 2016. Green synthesis and characterization of copper oxide nanoparticles using coffee powder extract. Journal of Nanostructure, 6(2): 160-164.
- Wani, A.H. and Shah, M.A., 2012. A unique and profound effect of MgO and ZnO nanoparticles on some plant pathogenic fungi. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 2(3): 40-44.
- Xu, J.F., Ji, W, Shen, Z.X., Tang, S.H., Ye, X.R., Jia, D.Z. and Xin, X.Q., 1999. Preparation and characterization of CuO nanocrystals. Journal of Solid State Chemistry, 147(2): 516-519.
nanoparticles against *Candida* spp. Biometals, 30: 6333-6340.
- Park, H.J., Kim, S.H., Kim, H.J., and Choi, S.H., 2006. A new composition of nanosized silica-silver for control of various plant diseases. Plant Pathology, 22: 295-302.
- Saligkarias, L.D., Gravanis, F.T. and Epton, H.A., 2002. Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato plants by the use of epiphytic yeast *Canadia guilliermondii* strains101 and us7 and *Candida oleophila* strain I-182: In vivo studies. Biological Control, 25: 143-150.
- Savithramma, N., Rao, M.L., Rukmini, K. and Devi, P.S., 2011. Antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized by using medicinal plants. International Journal of ChemTech Research, 3(3): 1394-1402.
- Sobhani, A., Abdossi, V., Zarinnia, V. and Oraghi Ardebili, Z., 2014. Evaluation of the antifungal

Archive of SID

www.SID.ir

Investigation on the control effects of green copper oxide (CuO) nanoparticles on the tomato gray mold disease caused by *Botrytis cinerea*

S. Kazemian[1], V. Zarrinnia[2*], M. Khosroshahli[1] and N. Hasanzadeh[3]

1- Department of Agricultural Biotechnology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2*- Corresponding author, Department of Plant Protection, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
E-mail: zarrinnia@gmail.com
3- Department of Plant Protection Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: November 2017 Revised: November 2018 Accepted: November 2018

Abstract

Tomato gray mold disease, caused by *Botrytis cinerea,* is one of the most important tomato diseases. In recent years, the application of nanoparticles for the control of plant diseases has been given special attention. In this research, the effect of copper oxide nanoparticles biosynthesized by plant extract of eucalyptus was investigated. Three experiments were conducted in order to control the severity of gray mold disease under different growth conditions. In the first experiment, the effects of nanoparticles at concentrations of 100, 200, 400 and 600 ppm were investigated. In the second experiment, two more concentrated extracts i.e. 800 and 1200 were investigated. In the third experiment, the effect of three concentrations of 400, 600 and 800 ppm of copper oxide nanoparticles on the severity of mildew disease on detached leaves was investigated. The results of all three experiments indicated that 1) Copper oxide nanoparticles can control the growth of *B. cinerea* and gray mildew disease in both *in vitro* and *in vitro* conditions. 2) The relationship between the concentration of copper oxide nanoparticles and the inhibitory effect on fungal growth and disease control was invertible and significant at 1% probability level ($P \leq 1\%$). In fact, the most effective concentrations were obtained at 400 and 600 ppm, 800 and 1200 ppm, and 600 and 800 ppm under *in vitro*, *in vivo*, and detached leaf assay, respectively. Accordingly, with increasing concentrations of copper oxide nanoparticles, the rate of growth of the fungus colony decreased and the severity of the disease decreased. Based on these results, the application of green synthesized copper oxide nanoparticles was recommended in controlling of gray mold disease caused by *Botrytis cinerea*.

Keywords: Green copper oxide nanoparticles, *Botrytis cinerea*, tomato, gray mold.

Archive of SID

www.SID.ir