www.jnm.iau-shahrood.ac.ir
نانومواد: ۸:۲۷ (۱۳۹۵) ۱۶۲-۱۵۳

بیوسنتز نانوذرات نقره و اثر کنترلی آن روی چند قارچ بیماری‌زای گیاهی

مهدی پورسینا، صفر علی مهدیان* و محمد علی تاجیک قنبری

گروه گیاه پزشکی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

تاریخ ثبت اولیه: ۱۳۹۵/۰۵/۰۱، تاریخ دریافت نسخه اصلاح شده: ۱۳۹۵/۰۶/۱۱، تاریخ پذیرش قطعی: ۱۳۹۵/۰۷/۱۵

چکیده

روش‌های تولید زیستی نانوذرات به علت کاهش هزینه و زیست‌سازگار بودن آنها، نسبت به روش‌های دیگر اولویت دارند. در این پژوهش از عصاره میوه سیب به منظور سنتز نانوذرات نقره استفاده شده است و اثر کلوئید نانوذرات به وجود آمده روی کنترل قارچ‌های بیمارگر Fusarium brachygibbosum، Cytospora chrysosperma، Diaporthe phaseolorum بررسی شده است. به عصاره میوه سیب محلول ۲ و ۱۰ میلی‌مولار نیترات نقره در دمای اتاق افزوده شد و تغییر رنگ محلول از زرد کمرنگ به قهوه‌ای مایل به قرمز موید تولید نانوذرات نقره در نظر گرفته شد. تشکیل نانوذرات نقره با وجود پیک جذبی در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتری اثبات شد. توزیع اندازه نانوذرات تولید شده و میانگین اندازه آنها توسط دستگاه تفرق دینامیکی نور (DLS) اندازه‌گیری شد. غلظت‌های مختلف کلوئید نانوذرات نقره به محیط PDA افزوده شد و قارچ‌های مورد آزمایش روی آن مایه‌زنی شدند. نتیجه نشان داد که نانوذرات به دست آمده در محیط کشت PDA روی رشد ریسه قارچ‌های Fusarium brachygibbosum، Cytospora chrysosperma، Diaporthe phaseolorum در غلظت ppm ۱۰ اثر بازدارندگی کامل داشتند. سنتز سبز نانوذرات نقره با روش زیستی و بدون استفاده از مواد شیمیایی مضر و اثر بازدارندگی نانوذرات نقره روی سه قارچ مهم بیماری‌زای گیاهی از نتایج این تحقیق بودند.

***واژه‌های کلیدی:* سنتز سبز، کنترل قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی، نانوذرات نقره.**

۱- مقدمه

فناوری نانو با طبیعت فرا رشته‌ای خود در آینده در برگیرنده همه علوم امروزی خواهد بود و به جای رقابت با فناوری‌های موجود، مسیر رشدشان را در دست گرفته و آنها را یکپارچه خواهد کرد. نانومواد دارای انواع گوناگونی هستند و از میان آنها، نانوذرات فلزی دارای اهمیت و کاربردهای فراوانی در زمینه‌های مختلف بوده و به ذراتی گفته می‌شود که حداقل در یک بعد دارای اندازه‌ای کمتر از ۱۰۰ نانومتر باشند [۳-۱]. در بین نانوذرات، اتم نقره به خاطر فعالیت بالای

* **عهده‌دار مکاتبات:** صفر علی مهدیان
نشانی: ساری، کیلومتر ۹ جاده دریا، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری، گروه گیاه پزشکی
تلفن: ۳۳۶۸۷۵۶۷-۰۱۱، **دورنگار:** ۳۳۶۸۷۵۶۷-۰۱۱، **پست الکترونیکی:** safaralim@gmail.com

ضد قارچی، ضد باکتریایی و ضد ویروسی اهمیت زیادی داشته و در پزشکی، کشاورزی و صنایع کاربردهای فراوانی دارد. به عنوان مثال در کشاورزی به منظور معالجه مرکبات مبتلا به بیماری پوسیدگی طوقه ناشی از قارچ Fusarium solani و همچنین برای معالجه درختان انجیر مبتلا به بیماری شانکر ناشی از قارچ می‌توان محل آلودگی را بریده و روی محل زخم را با کلوئید نانوذرات نقره پوشش داد و روی آن را با چسب باغبانی پانسمان کرد. برای محافظت مرکبات از بیماری گموز ناشی از قارچ‌های Phytophthora parasitica و Phytophthora citrophthora می‌توان روی طوقه درخت را تا ارتفاع ۲۰ سانتی‌متر با کلوئید نانوذرات نقره پوشش داد و روی آن را با چسب باغبانی پانسمان نمود [۴،۵].

تولید نانوذرات، به روش‌های مختلف فیزیکی، شیمیایی و زیستی امکان‌پذیر است. احیای شیمیایی روشی متداول برای تولید نانوذرات فلزی بوده و اغلب سبب تولید نانوذراتی با پراکندگی سایز مناسب می‌شود. اما در این روش، استفاده از مواد شیمیایی سمی، اغلب غیر قابل اجتناب بوده و باقی ماندن این مواد در سطح نانوذرات، کاربرد آنها را در زمینه‌های زیستی محدود می‌سازد. اشکال اصلی روش‌های فیزیکی، مصرف بسیار زیاد انرژی برای حفظ فشار و دمای بالا و تولید کم نانوذرات است [۹-۶]. با توجه به معایب ذکر شده، استفاده از روش‌های سنتز سبز جهت تولید نانوذرات زیست‌سازگار پیشنهاد شد و به دنبال آن روش‌های سنتز زیستی، یعنی استفاده از گیاهان یا عصاره گیاهی برای تولید نانوذرات، توسعه یافت. تا به حال عصاره چندین گیاه به طور موفقیت‌آمیزی برای تولید نانوذرات فلزی استفاده شده است [۵]. سنتز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره گیاهان (سنتز سبز نانوذرات نقره) در گزارش‌های متعددی ارائه شده است. علی و همکارانش در سال ۲۰۱۶ نانوذرات نقره را با استفاده از عصاره سیب با اندازه میانگین ۳۰ نانومتر سنتز کردند و مشخص کردند غلظت مؤثر برای از بین بردن باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی در محدوده ۱۲۵ تا ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر است [۱۰]. احمد و شارما در سال ۲۰۱۲ با استفاده از عصاره میوه آناناس نانوذرات نقره را با اندازه میانگین ۱۲ نانومتر سنتز کردند و مدت پایداری آن را تا چهار ماه اعلام کردند [۸]. روی و همکاران در سال ۲۰۱۴ با استفاده از عصاره میوه سیب، نانوذرات نقره را با اندازه میانگین ۲۰ نانومتر سنتز کردند و اثر قارچ‌کشی آن را روی دو گونه قارچ Aspergillus niger و Aspergillus wentii بررسی کردند. یافته‌های آنها نشان داد که نانوذرات نقره خاصیت قارچ‌کشی دارند و می‌توانند در مهار قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی مورد استفاده قرار گیرند [۱۱].

در فرآیند سنتز نانوذرات فلزی توسط عصاره گیاه، احیا کننده‌های گیاهی نقش اصلی را ایفا می‌کنند. این مواد شامل ویتامین‌ها، فلاونوئیدها، مشتقات آسکوربیک اسید، اسید کلروژنیک و پلی فنول‌ها می‌باشند [۸،۹]. واکنش اصلی در این فرآیند واکنش اکسیداسیون و احیا است. در فرآیند ساخته شدن نانوذرات نقره، احیاکننده‌های گیاهی یا همان آنتی اکسید آنها با دادن الکترون به یون نقره، آن را احیا می‌کنند و خود با از دست دادن الکترون اکسید می‌شوند. یون نقره با گرفتن الکترون به اتم نقره مبدل می‌شود. اتم‌های نقره در آب با تجمع به دور هم به خوشه‌هایی در ابعاد نانومتریک تبدیل می‌شوند. اما نانوذرات نقره به دلیل واکنش‌پذیری بالای آنها، به شدت تمایل به آگلومره شدن دارند. برای جلوگیری از این حالت، به محلول واکنش یک استابیلایزر یا پایدار کننده اضافه می‌شود تا نانوذرات نقره برای مدت زمان طولانی‌تری در کلوئید پایدار بمانند. برای این منظور از پلی وینیل پیرولیدین که یک پایدار کننده شیمیایی است استفاده می‌شود. البته مواد آلی گیاهی خود به عنوان پایدار کننده عمل می‌کنند، اما این خاصیت آنها نمی‌تواند برای مدت طولانی دوام داشته باشد [۱۲].

نقره از نظر ترتیب سمیت عناصر فلزی برای میکروارگانیزم‌ها، در درجه اول قرار دارد و پس از آن جیوه و مس قرار می‌گیرند. افزایش خاصیت قارچ‌کشی این عناصر با افزایش وزن اتمی آنها تطابق دارد. اما از نظر غیرمحلول بودن سولفات آنها، نقره در درجه دوم و از نظر پایداری

کلات و خاصیت الکترونگاتیوی، نقره در درجه سوم قرار می‌گیرد. قیمت بالای نقره مانع از مصرف نقره به عنوان قارچ‌کش یا باکتری‌کش در کشاورزی می‌شود [۱۳]. این احتمال وجود دارد که در آینده مقدار اندکی از نانوذرات نقره بتوانند بیمارگرهای گیاهی را در سطح وسیعی کنترل نمایند. در این صورت مصرف جزیی نقره در سطح وسیع ممکن است قیمت بالای آن را توجیه نماید.

مهمترین عوامل بیماری‌زای گیاهان قارچ‌ها هستند که دارای شاخه‌هایی مانند آسکومایکوتا (Ascomycota)، بازیدیومایکوتا (Basidiomycota)، دترومایکوتا (Deutromycota) و شبه قارچ‌های اومایکوتا (Oomycota) و چند گروه دیگر هستند. گروه قارچ‌های ناقص یا شاخه دترومایکوتا (Deutromycota) شامل مهمترین بیمارگرهای گیاهی هستند. در این گروه قارچ‌هایی مانند Diaporthe phaseolorum با مرحله غیرجنسی Phomopsis sp. باعث سیاه شدن غلاف و ساقه گیاه سویا می‌شود و به نام شانکر ساقه و غلاف سویا معروف است. این بیماری می‌تواند تولید بذر سویا را شدیدا کاهش دهد. قارچ Cytospora chrysosperma روی درختان مختلف به ویژه روی درخت سیب و هسته‌داران باعث زخم پوست شاخه و تنه می‌شود در نتیجه آب و مواد غذایی منتقل نمی‌شود و پژمردگی بوجود می‌آید. این بیماری به نام شانکر سیتوسپورایی درختان معروف است. قارچ Fusarium brachygibbosum روی برگ گیاه خرزهره لکه برگی بوجود می‌آورد و درخت را ضعیف می‌کند. از قارچ‌های مهم بیماری‌زای دیگر این گروه Alternaria alternata است که روی برگ و ساقه سیب‌زمینی، لکه‌های موجی شکل بوجود می‌آورد و به نام لکه موجی سیب‌زمینی نیز معروف است [۱۴].

هدف از این پژوهش استفاده از عصاره میوه سیب به منظور سنتز زیستی نانوذرات نقره و بررسی اثر کلوئید نانوذرات نقره به وجود آمده در کنترل قارچ های بیمارگر گیاهی شامل Diaporthe phaseolorum ، Cytospora chrysosperma، Fusarium brachygibbosum بوده است.

۲- فعالیت‌های تجربی

۲-۱- تهیه عصاره گیاهی و نمونه قارچی

به منظور تهیه عصاره مورد نیاز، میوه سیب با رنده خرد شد و عصاره آن با پارچه نخی گرفته شد. عصاره تهیه شده بلافاصله با کاغذ صافی در یخچال فیلتر شد تا از اکسید شدن مواد آلی آن جلوگیری شود.

قارچ‌های مورد استفاده در این پژوهش از بین قارچ‌های موجود در آزمایشگاه قارچ‌شناسی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری انتخاب شدند. به منظور اطمینان از شناسایی قارچ‌های انتخاب شده، از هر یک از قارچ‌های Diaporthe phaseolorum عامل شانکر ساقه و غلاف سویا، Cytospora chrysosperma عامل شانکر سیتوسپورایی درختان و Fusarium brachygibbosum عامل لکه برگی گیاه خرزهره یک قطعه ۵ mm برداشت و در محیط مایع سیب‌زمینی دکستروز PDB (potato dextrose broth) کشت داده شدند. سپس DNA آنها مطابق روش‌های متداول استخراج شد. جهت شناسایی مولکولی از آغازگرهای عمومی ITS (Internal Transcribed Spacer) شامل یکی ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') و دیگر ITS5 (5'- GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') استفاده شد [۱۵]. مراحل استخراج DNA با روش دویل و دویل انجام گرفت [۱۶]. در این روش نمونه‌ها در محیط مایع PDB روی شیکر با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه در دمای اتاق کشت داده شدند. توده میسلیومی به دست آمده با آب مقطر سترون شستشو شد و پس از آبگیری، در هاون سترون سرد به کمک ازت مایع پودر شد. محلول پایه شامل آب دو بار تقطیر سترون ۱۶/۳ µl، بافر PCR ۲/۵ µl، کلرید منیزیم ۱ µl، dNTPs ۱ µl، آغازگرها ۲ µl (12.5 Pmol/µl)، آنزیم Taq DNA polymerase، ۰/۲ µl (4 unit) بود. از دستگاه ترموسایکلر Peqlab (Primus 25 advanced) جهت

تکثیر استفاده شد. مطابق برنامه داده شده به دستگاه، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز یا PCR (Polymerase Chain Reaction) بر اساس یک چرخه واسرشت اولیه ۴ دقیقه °C ۹۴ ، ۳۵ چرخه واسرشت ۱ دقیقه °C ۹۴ ، مرحله اتصال ۱ دقیقه °C ۶۰، گسترش ۱ دقیقه °C ۷۲ و یک چرخه گسترش نهایی به مدت ۱۰ دقیقه °C ۷۲ انجام شد.

پس از اطمینان از تکثیر DNA، باقی‌مانده محصول PCR برای تعیین توالی نمونه‌ها به شرکت بیونیر کره جنوبی ارسال و توالی ژنوم نمونه‌ها به دست آمد. توالی به دست آمده از طریق نرم‌افزار بلاست در پایگاه اطلاعاتی NCBI (National Center for Biotechnology Information) مورد بررسی قرار گرفت وهمولوژی آنها با توالی‌های ثبت شده در ژن بانک (Gen Bank) تعیین شد.

۲-۲- سنتز نانوذرات نقره

برای تهیه کلوئید نانوذرات نقره بر پایه غلظت‌های ۲، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار محلول نیترات نقره، به ترتیب مقادیر ۰/۰۰۳۳۸، ۰/۰۰۸۴۵ و ۰/۰۱۶۹ گرم نیترات نقره در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد (نیترات نقره با خلوص ۹۹ درصد از شرکت مرک تهیه شد). از عصاره فیلتر شده میوه سیب مقادیر ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکرولیتر به ترتیب به محلول‌های ۲، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار نیترات نقره افزوده شد. برای جلوگیری از آگلومره شدن و تجمع نانوذرات نقره از یک پایدار کننده شیمیایی به نام پلی وینیل پیرولیدین استفاده شد. برای این منظور، مقادیر ۰/۰۱، ۰/۰۲۵ و ۰/۰۵ گرم پلی وینیل پیرولیدین به ترتیب به محلول‌های ۲، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار نیترات نقره افزوده شد.

محلول نیترات نقره مانند آب بی‌رنگ است و تغییر رنگ یا رسوب سیاه رنگ در ته محلول نشان دهنده آن است که نیترات نقره در آب حل نشده است. به همین دلیل از آب مقطر خالص و سترون استفاده شد. نیترات نقره با عناصر موجود در آب واکنش داده و موجب تولید رسوب سیاه رنگ در ته محلول می‌شود. احتمالا آب دیونیزه برای این آزمایش مناسب نیست، چون موجب تولید رسوب سیاه رنگ در ته فالکون حاوی محلول نیترات نقره شد. این رسوب موید آن است که آب دیونیزه حاوی مقادیر اندکی از عناصر (احتمالا یون آهن) می‌باشد که با نیترات نقره واکنش داده و موجب تولید رسوب سیاه رنگ می‌شود. برای حل کردن نیترات نقره در آب، از آب سرد استفاده شد، چون نیترات نقره در آب سرد بهتر حل می‌شود. مقدار ۲۵۰ میکرولیتر عصاره فیلتر شده به محلول نیترات نقره افزوده شد. عصاره با سمپلر به صورت قطره قطره به فالکون حاوی محلول نیترات نقره که در حال تکاندن بود افزوده شد. عمل تکاندن فالکون حاوی محلول نیترات نقره به منظور جلوگیری از تولید نانوذرات نقره با اندازه درشت و همچنین توزیع اندازه یکنواخت انجام شد.

۲-۳- روش‌های ارزیابی خواص

احیای یون‌های نقره به اتم‌های نقره و تشکیل نانوذرات نقره توسط عوامل احیا کننده عصاره میوه سیب بعد از چند دقیقه شروع و تا یک ساعت کامل شد. این پدیده با تغییر رنگ محلول واکنش همراه بود. به منظور تعیین بیشترین طول موج جذبی نور ماوراء بنفش (طیف‌سنجی UV-Visible) از دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد. طیف جذبی نمونه‌ها در محدوده طول موج ۸۰۰-۲۰۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر مورد ارزیابی قرار گرفت [۳،۱۷].

۲-٤- تعیین اندازه نانوذرات به روش تفرق دینامیکی نور

نحوه توزیع و میانگین اندازه نانوذرات نقره با استفاده از دستگاه DLS (Dynamic Light Scattering) تعیین شد. محدوده قابل اندازه‌گیری توسط این دستگاه ۰/۶ نانومتر تا ۶ میکرومتر است. بدین منظور ابتدا جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۳۳ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین شد و پس از تعریف یک دستورالعمل عملیاتی استاندارد برای آنها (از جمله جذب نمونه در طول موج ذکر شده، ضریب

شکست نانوذرات نقره و نوع حلال)، توزیع و میانگین اندازه نانوذرات نقره به دست آمد.

۲-۵- بررسی اثر نانوذرات نقره بر قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی

به منظور بررسی اثر نانوذرات نقره بر روی سه قارچ بیماری‌زای گیاهی، در ابتدا قارچ‌های Diaporthe phaseolorum، Cytospora chrysosperma، Fusarium brachygibbosum بعلاوه Alternariaalternata عامل لکه موجی سیب‌زمینی، در محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار PDA (Potato Dextrose Agar) تکثیر شدند. مقادیر ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ میکرولیتر کلوئید نانوذرات نقره در ۱۰ میلی‌لیتر محیط PDA حل شد و قارچ‌های مورد آزمایش روی آن کشت داده شدند. از کشت جوان قارچ‌ها دیسک‌هایی به قطر پنج میلی‌متر برداشت شد و در مرکز تشتک آزمایش حاوی محیط کشت به صورت معکوس قرار داده شد. تشتک‌های پتری مایه‌زنی شده در دمای ۲۵ °C در اتاقک رشد نگهداری شدند. پس از گذشت ۴۸ ساعت رشد رویشی هاله قارچ تا زمانی که سطح محیط کشت تشتک پتری شاهد توسط قارچ به طور کامل اشغال شود، به طور روزانه اندازه‌گیری و یادداشت شد. درصد بازدارندگی از رشد قارچ در تیمارهای مختلف به وسیله فرمول ابوت (معادله ۱) تصحیح شد [۱۸]. در تشتک پتری شاهد به جای کلوئید نانوذرات نقره آب مقطر سترون افزوده شد.

$$IG = [(C-T)/C] \times 100 \quad (۱)$$

در این فرمول:

IG = درصد بازدارندگی از رشد میسلیومی قارچ بیمارگر

C = قطر رشد میسلیوم بیمارگر در تشتک شاهد

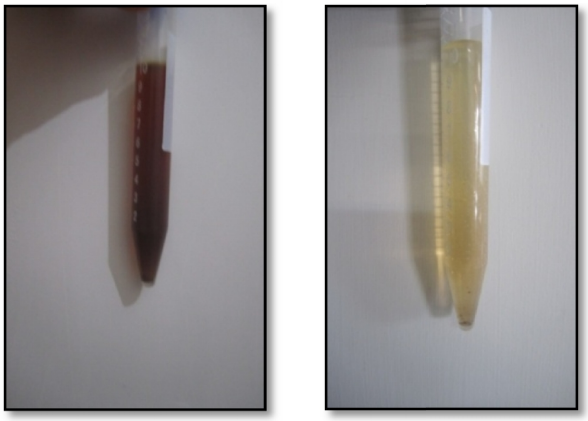
T = قطر رشد میسلیوم بیمارگر در هر تیمار

در نظر گرفته شده‌اند.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- سنتز نانوذرات نقره

نتیجه آزمایش سنتز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره فیلتر شده میوه سیب نشان داد که رنگ محلول واکنش از زرد کمرنگ به قهوه‌ای مایل به قرمز تغییر پیدا کرد (شکل ۱). این تغییر رنگ موید احیای کاتیون‌های فلزی نقره و سنتز نانوذرات نقره بود که به نوسانات تجمعی الکترون‌های آزاد سطح فلز که توسط یک میدان الکترومغناطیسی القا شده‌اند، نسبت داده می‌شود [۱۹].

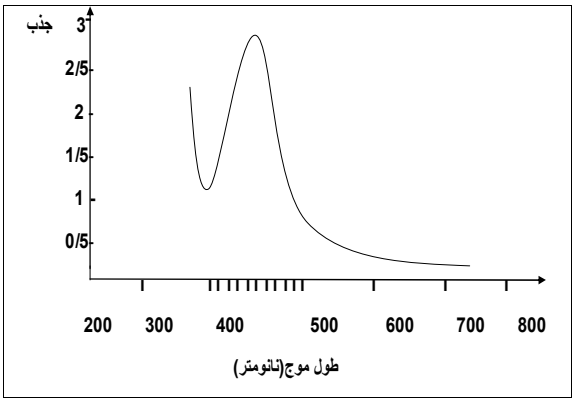


(الف) (ب)

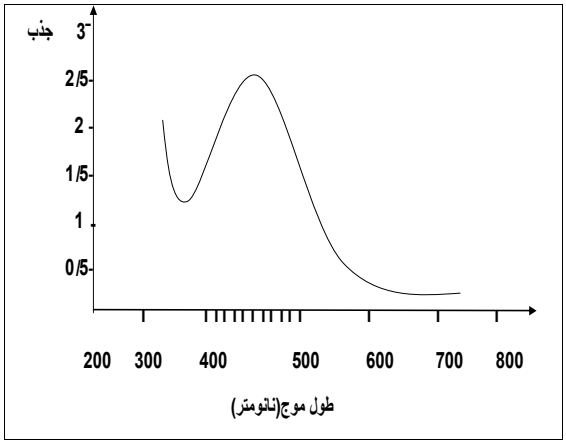
شکل ۱: تغییر رنگ محلول نیترات نقره و عصاره میوه سیب در اثر احیای کاتیون‌های فلزی نقره، الف) عصاره میوه سیب بدون محلول نیترات نقره و ب) عصاره میوه سیب بعلاوه محلول نیترات نقره (تغییر رنگ و تشکیل کلوئید نانوذرات نقره).

۳-۲- طیف‌سنجی نور ماوراء بنفش

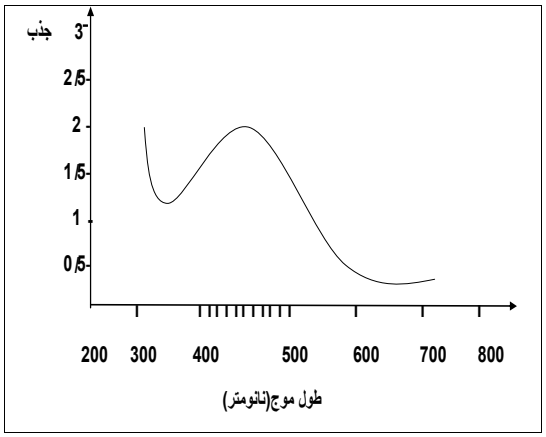
نتیجه تعیین بیشترین طول موج جذبی نور ماوراء بنفش (طیف‌سنجی UV-Visible) توسط اسپکتروفتومتر نشان داد که کلوئید نانوذرات نقره در بازه طول موج nm ۸۰۰-۲۰۰، پیک جذبی در طول موج ۴۵۰ نانومتر تولید می‌کند که موید وجود نانوذرات نقره در محلول مورد آزمایش بود (شکل ۲). این نتیجه با گزارش‌های دیگر انطباق داشت [۲۳-۲۰]. بر اساس این گزارش‌ها پیک‌های باریک و کم‌عرض مؤید تولید نانوذرات با میانگین اندازه کوچکتر و پیک‌های پهن و



(الف)



(ب)



(ج)

شکل ۲: طیف جذب نور ماوراء بنفش کلوئید نانوذرات نقره با دستگاه اسپکتروفتومتر بر اساس غلظت‌های، الف) ۲mM، ب) ۵mM و ج) ۱۰mM محلول نیترات نقره.

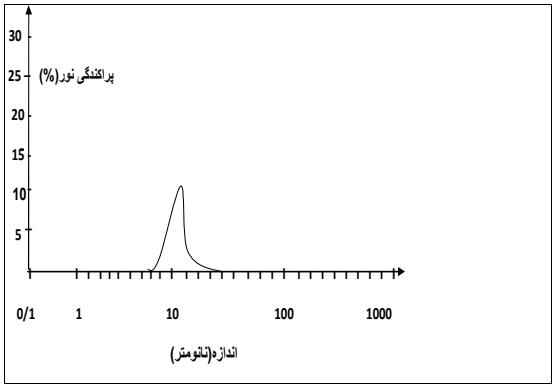
عریض موید نانوذرات با میانگین اندازه بزرگتر هستند. در این پژوهش آزمایش تفرق دینامیکی نور نیز این مطلب را ثابت نمود. با مشاهده پیک‌ها می‌توان نتیجه گرفت که غلظت‌های پائین‌تر نیترات نقره باعث تولید نانوذرات با میانگین اندازه کوچکتر (شکل۲-الف) و غلظت‌های بالاتر نیترات نقره باعث تولید نانوذرات با میانگین اندازه بزرگتر (شکل ۲-ج) می‌شوند.

۳-۳- اندازه نانوذرات به روش تفرق دینامیکی نور

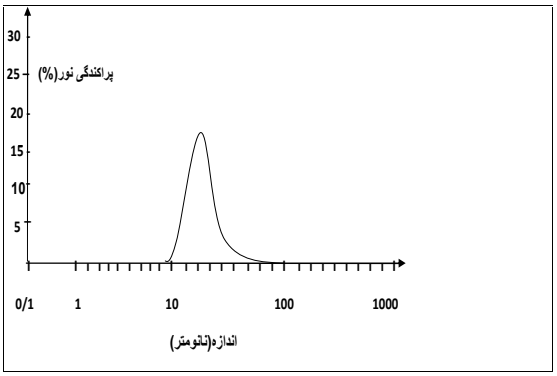
نتیجه میانگین اندازه نانوذرات نقره و تعیین توزیع اندازه آنها با دستگاه DLS (Dynamic Light Scattering) نشان داد که توزیع اندازه نانوذرات نقره سنتز شده بر پایه غلظت ۲ میلی‌مولار محلول نیترات نقره بین ۸ تا ۵۰ نانومتر و میانگین اندازه آنها ۱۶/۴ نانومتر شد (شکل ۳-الف). همچنین، توزیع اندازه نانوذرات نقره تولید شده بر پایه غلظت ۵ میلی‌مولار محلول نیترات نقره بین ۱۰ تا ۹۰ نانومتر و میانگین اندازه آنها ۴۳/۲ نانومتر (شکل ۳-ب) و توزیع اندازه نانوذرات نقره تولید شده بر پایه غلظت ۱۰ میلی‌مولار محلول نیترات نقره بین ۳۸ تا ۲۷۶ نانومتر و میانگین اندازه آنها ۸۷/۴ نانومتر (شکل ۳-ج) شد. از این آزمایش نتیجه گرفته می‌شود که هر چه غلظت محلول نیترات نقره برای تولید کلوئید نانونقره بیشتر باشد منجر به تولید نانوذرات با توزیع اندازه و میانگین اندازه بالاتری می‌شود.

۳-٤- شناسایی نمونه‌های قارچی

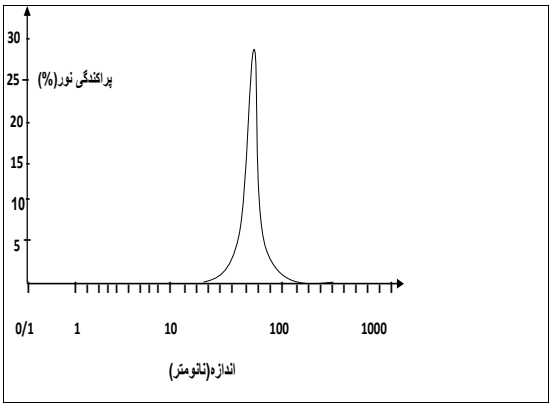
شناسایی مولکولی سه نمونه قارچی با استفاده از آغازگرهای ITS4 و ITS5 نشان داد که نام‌گذاری نمونه‌های تهیه شده صحیح بوده است. توالی ناحیه ITS مربوط به قارچ‌های Cytospora chrysosperma، Diaporthe phaseolorum، Fusarium brachygibbosum در پایگاه اطلاعاتی NCBI با نرم افزار BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) با ترادف‌های موجود در ژن بانک مقایسه شد و مشخص شد توالی‌های به دست آمده بیش از ۹۹ درصد با گونه‌های نام‌گذاری شده ترادف داشتند. شماره‌های تعیین توالی به بانک ژن سپرده شد. قارچ Alternariaalternata بدون شناسایی مجدد مورد آزمایش قرار گرفت.



(الف)



(ب)



(ج)

شکل ۳: توزیع اندازه نانوذرات نقره به روش تفرق دینامیکی نور با دستگاه DLS بر اساس غلظت‌های، الف) ۲ mM، ب) ۵ mM و ج) ۱۰ mM محلول نیترات نقره.

۳-۵- اثر نانوذرات نقره روی قارچ‌های بیمارگر گیاهی

در این آزمایش از غلظت‌های پایه ۲ و ۱۰ میلی‌مولار نیترات نقره برای بررسی اثر نانوذرات نقره روی قارچ‌های بیمارگر مورد آزمایش استفاده شد. نتیجه تاثیر نانوذرات نقره با غلظت پایه ۲ میلی‌مولار محلول نیترات نقره روی قارچ‌های اشاره شده در جدول ۱ نشان داده شده است.

همانطور که جدول ۱ نشان می‌دهد اثر کنترلی کلوئید نانوذره نقره بر پایه غلظت ۲ میلی‌مولار نیترات نقره بر روی قارچ F. brachygibbosum بیشتر از قارچ‌های دیگر بود. در پایان روز چهارم قطر ریسه این قارچ نسبت به نمونه شاهد کمترین اندازه را داشت. بنابراین قارچ F. brachygibbosum نسبت به قارچ‌های دیگر حساسیت بیشتری نسبت به نانوذره نقره نشان داد. حساسیت قارچ‌های دیگر به ترتیب مربوط به C. chrysosperma، D. phaseolorum و A. alternata بود. با توجه به اینکه هر چه رشد قارچ سریع‌تر باشد مقدار بیشتری آنزیم و پروتئین توسط قارچ تولید می‌شود و این آنزیم‌ها و پروتئین‌ها نقاط هدف سموم قارچ‌کش از جمله نانوذرات نقره هستند. بنابراین احتمال داده می‌شود که حساسیت قارچ F. brachygibbosum نسبت به دیگر قارچ‌های مورد آزمایش مربوط به رشد سریع‌تر آن باشد. به عبارت دیگر هر چه رشد قارچ سریع‌تر باشد نسبت به کلوئید نانوذرات نقره حساسیت بیشتری از خود نشان می‌دهد. این فرض در قارچ A. alternata صدق نمی‌کند. زیرا از نظر رشد قارچی در درجه دوم قرار گرفته است و در روز چهارم تشتک پتری شاهد با میسلیوم پر شده است. اما تشتک‌های تیمار شده با ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرولیتر نانوذره نقره حساسیت کمی به آن نشان دادند و در روز پنجم به ترتیب ۴۲ و ۳۴ میلی‌متر قطر رشدی داشتند (جدول ۱). حساسیت دو قارچ دیگر یعنی D. phaseolorum و C. chrysosperma در مقابل نانوذره نقره نزدیک بهم بود و سرعت رشد کلونی آنها تقریبا یکسان بود. همچنین نتیجه نشان داد مقدار ۵۰۰ میکرولیتر کلوئید نانوذرات نقره سنتز شده به روش زیستی بر پایه غلظت ۲ میلی‌مولار محلول نیترات نقره در ۱۰ میلی‌لیتر محیط PDA اثر بازدارندگی کامل روی قارچ‌های بیماری‌زای مورد آزمایش داشت. در آزمایش مشابه که با کلوئید نانوذرات نقره تهیه شده به روش پودر شیمیایی انجام شد نیز مقدار ۵۰۰ میکرولیتر نانوذرات نقره (به صورت پودر) در ۱۰ میلی‌لیتر محیط PDA اثر بازدارندگی کامل

جدول ۱: نتیجه تاثیر کلوئید نانوذرات نقره بر پایه غلظت ۲ میلی‌مولار محلول نیترات نقره روی قارچ‌های بیمارگر گیاهی.

نانوذره نقره µl	قطر ریسه قارچ C. chrysosperma در روز (mm)					قطر ریسه قارچ D. phaseolorum در روز (mm)				
	دوم	سوم	چهارم	پنجم	ششم	دوم	سوم	چهارم	پنجم	ششم
۱۰۰	۶*	۱۶	۲۶	۲۸	۳۰	۸	۱۸	۲۸	۳۲	۳۶
۲۰۰	۲	۱۰	۱۶	۲۰	۲۲	۴	۱۴	۱۷	۲۲	۲۶
۵۰۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
شاهد	۱۴	۲۴	۳۰	۴۵	۶۰	۱۴	۲۶	۳۲	۴۸	۶۰
نانوذره نقره µl	قطر ریسه قارچ F. brachygibbosum در روز (mm)					قطر ریسه قارچ A. alternata در روز (mm)				
	دوم	سوم	چهارم	پنجم	ششم	دوم	سوم	چهارم	پنجم	ششم
۱۰۰	۱۰	۱۴	۲۰	–	–	۸	۲۲	۳۴	۴۲	–
۲۰۰	۶	۱۰	۱۲	–	–	۶	۱۸	۲۶	۳۴	–
۵۰۰	۰	۰	۰	–	–	۰	۰	۰	۰	–
شاهد	۲۰	۴۲	۶۰	–	–	۱۷	۲۸	۴۵	۶۰	–

* اندازه‌گیری از پایان ۴۸ ساعت (روز دوم) شروع شد، – خط تیره نشانه پایان اندازه‌گیری است (زمانی که قطر ریسه در تشتک شاهد به mm ۶۰ رسیده باشد).

روی قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی داشت. این اثر در غلظت پایه ۱۰ میلی‌مولار محلول نیترات نقره با مقدار ۲۰۰ میکرولیتر کلوئید نانوذرات نقره مشاهده شد و از رشد قارچ‌ها بازدارندگی کامل داشت (جدول ۲).

از این آزمایش می‌توان نتیجه گرفت که هر چه غلظت محلول نیترات نقره برای تهیه کلوئید نانوذره نقره کمتر باشد، راندمان تاثیر نانوذرات نقره روی قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی بیشتر می‌شود (غلظت پایه ۲ وقتی ۵ برابر شد مقدار نانوذرات نقره برای بازدارندگی کامل فقط ۲/۵ برابر کاهش یافت). همچنین داده‌های جدول ۱ و ۲ نشان داد که قارچ F. brachygibbosum نسبت به قارچ‌های دیگر مورد آزمایش حساسیت بیشتری در مقابل نانوذرات نقره داشت.

نتیجه این پژوهش نشان داد که تیمار ۵۰۰ میکرولیتر کلوئید نانوذرات نقره بر پایه غلظت ۲ میلی‌مولار نیترات نقره در ۱۰ میلی‌لیتر محیط PDA می‌تواند اثر بازدارندگی کامل روی قارچ‌های بیمارگر داشته باشد. این غلظت معادل ۱۰ ppm است که در محیط PDA تاثیر بازدارندگی کامل روی قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی داشت. اساس سنتز نانوذرات نقره، احیای کاتیون‌های نقره و خنثی شدن بار الکتریکی آنهاست. تغییر رنگ محلول واکنش از زرد کمرنگ به قهوه‌ای مایل به قرمز موید احیای کاتیون‌های نقره و تشکیل نانوذرات نقره است (شکل ۱). پیک جذبی نانوذرات نقره در محدوده طول موج ۴۵۰ نانومتر [۲۰،۲۴] به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر موید وجود نانوذرات نقره است. در روش سنتز سبز، نانوذرات نقره بدون استفاده از احیا کننده‌های شیمیایی تولید می‌شوند و می‌توان از آنها جهت کنترل بیماری‌های درختان میوه استفاده کرد.

استفاده از کلوئید نانونقره تولید شده به روش زیستی برای کنترل بیماری‌هایی مانند پوسیدگی طوقه مرکبات ناشی از قارچ Phytophthora parasitica و شانکر سیتوسپورایی درختان میوه نسبت به سموم شیمیایی رایج مانند متالاکسیل و پنکونازول ترجیح دارد. از طرفی قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی نمی‌توانند به نانوذرات نقره مقاومت پیدا کنند چون نانوذرات نقره نقاط بسیاری را در غشای سیتوپلاسمی سلول‌های قارچی مانند آنزیم‌های زنجیره تنفسی و مولکول‌های سیتوپلاسمی آنها مانند پروتئین‌ها مورد هدف قرار می‌دهند. همچنین کلوئید نانونقره نسبت به سموم آلی دوام بیشتری دارد و برای مدت طولانی‌تری می‌تواند گیاه را از حمله قارچ‌های بیماری‌زا محافظت کند [۱۳]. در این

جدول ۲: نتیجه تاثیر کلوئید نانوذرات نقره بر پایه غلظت ۱۰ میلی‌مولار محلول نیترات نقره روی قارچ‌های بیمارگر گیاهی.

	قطر ریسه قارچ C. chrysosperma در روز (mm)					قطر ریسه قارچ D. phaseolorum در روز (mm)				
نانوذره نقره µl	دوم	سوم	چهارم	پنجم	ششم	دوم	سوم	چهارم	پنجم	ششم
۱۰۰	۵*	۸	۱۳	۲۳	۲۶	۴	۶	۱۳	۲۰	۲۴
۲۰۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۵۰۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
شاهد	۱۴	۲۴	۳۰	۴۵	۶۰	۱۴	۲۶	۳۲	۴۸	۶۰
	قطر ریسه قارچ F. brachygibbosum در روز (mm)					قطر ریسه قارچ A. alternata در روز (mm)				
نانوذره نقره µl	دوم	سوم	چهارم	پنجم	ششم	دوم	سوم	چهارم	پنجم	ششم
۱۰۰	۱۰	۱۲	۱۸	–	–	۵	۱۶	۲۰	۳۶	–
۲۰۰	۰	۰	۰	–	–	۰	۰	۰	۰	–
۵۰۰	۰	۰	۰	–	–	۰	۰	۰	۰	–
شاهد	۲۰	۴۲	۶۰	–	–	۱۷	۲۸	۴۵	۶۰	–

* اندازه‌گیری از پایان ۴۸ ساعت (روز دوم) شروع شد، – خط تیره نشانه پایان اندازه‌گیری است (زمانی که قطر ریسه در تشتک شاهد به mm ۶۰ رسیده باشد).

تحقیق ثابت شد که کلوئید نانونقره تولید شده به روش زیستی به مدت ۴ ماه پایداری خود را حفظ می‌کند. این نتیجه با تهیه گراف اسپکتروفوتومتری از کلوئید نانوذرات نقره به دست آمد. بر اساس نتایج به دست آمده، کلوئید نانوذرات نقره بعد از گذشت ۴ ماه از تولید، پیک جذبی ۴۵۰ نانومتر را در آزمایشات اسپکتروفوتومتری نشان داد که موید وجود نانوذرات نقره در محلول واکنش است. می‌توان گفت علت آن مربوط به مولکول‌های آلی موجود در عصاره میوه سیب مانند فلاونوئیدها، ویتامین‌ها و ترپنوئیدها است که با احاطه اتم‌های سطحی نانوذرات نقره مانع از فروپاشی یا کلوخه شدن نانوذرات نقره می‌شوند. این یافته با گزارش محققان دیگر تطابق دارد [۸].

مقایسه تاثیر نانوذرات نقره با نیترات نقره نشان داد که کلوئید نانوذرات نقره نسبت به محلول نیترات نقره روی قارچ‌های مورد آزمایش اثر بازدارندگی بیشتری دارد. ذرات نقره در حالت نانو نسبت به حالت یونی از نظر شیمیایی فعال‌تر شده و در حالت نانویی روی قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی اثر بازدارندگی بیشتری داشتند. این یافته با گزارش‌های محققان دیگر تطابق دارد [۱۰،۱۱]. به نظر می‌رسد نیترات نقره وقتی به نانوذره خود تبدیل می‌شود اثر قارچ‌کشی آن تا چند برابر می‌تواند افزایش یابد.

نتیجه مقایسه تاثیر نانوذرات نقره (تهیه شده به صورت پودر شیمیایی) با کلوئید نانوذرات نقره سنتز شده به روش زیستی روی قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی نشان داد که نانوذرات نقره تهیه شده با پودر شیمیایی اثر بیشتری در بازدارندگی از رشد قارچ داشتند. این اثر به طور میانگین سه برابر اثر کلوئید نانوذرات نقره سنتز شده به روش زیستی بود. احتمال داده می‌شود دلیل این امر به این خاطر است که اطراف اتم‌های سطحی نانونقره که با روش زیستی تهیه می‌شوند با مولکول‌های آلی موجود در عصاره گیاهی مانند فلاونوئیدها، ترپنوئیدها، تانن‌ها و اسیدهای آلی پوشیده می‌شود که از واکنش پذیری نانوذرات نقره با سلول‌های قارچی می‌کاهند و موجب کاهش اثر بازدارندگی نانوذرات نقره روی قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی می‌شوند.

۴- نتیجه‌گیری

در این کار پژوهشی آب میوه سیب با رنده کردن و گذراندن از پارچه نخی برای سنتز سبز نانوذرات نقره به کار رفت. نتایج گویای سنتز نانوذرات نقره با اندازه میانگین ۴۹

نانومتر در این روش بود. تغییر رنگ محلول واکنش از زرد کمرنگ به قهوه‌ای مایل به قرمز و پیک جذبی نانوذرات نقره در محدوده طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر موید وجود نانوذرات نقره در نظر گرفته شد. نانوذرات تهیه شده در غلظت معادل ppm ۱۰ در محیط PDA اثر بازدارندگی کامل روی قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی داشت. اثر نانوذرات نقره در مقایسه با نیترات نقره نشان داد که کلوئید نانوذرات نقره نسبت به محلول نیترات نقره روی قارچ‌های مورد آزمایش اثر بازدارندگی بیشتری داشت. مقایسه نانوذرات نقره سنتز شده به روش زیستی با نانوذرات نقره تهیه شده به صورت پودر شیمیایی روی قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی نشان داد که نانوذرات نقره تهیه شده به صورت پودر شیمیایی اثر بیشتری در بازدارندگی از رشد قارچ داشتند. روش سنتز سبز می‌تواند به عنوان روش دوست‌دار محیط زیست و ارزان مورد استفاده قرار گیرد و استفاده از نانوذرات برای کنترل بیماری‌های گیاهی می‌تواند در این رشته تحول ایجاد نماید.

مراجع

[1] F. Mansouri, G.R. Amiri, M. Fatemi, *Nanomed J.*, **3**, 2016, 196.
[2] T. Takeshima, Y. Tada, N. Sakaguchi, F. Watari, B. Fugetsu, *Nanomaterials*, **5**, 2015, 284.
[3] J.Y. Song, B.S. Kim, *Biopress Biosyst. Eng.*, **32**, 2009, 79.
[۴] کمال جانقربان، علی میرزایی، مریم بنیانی، "فناوری نانو، اصول و کاربردها (ترجمه)"، انتشارات دانشگاه شیراز، ۱۳۹۲.
[۵] زهرا شریعتی‌نیا، فرامرز افشار طارمی، "نانو زیست فناوری، مبانی و کاربردها"، انتشارات دانشگاه امیرکبیر، ۱۳۹۱.
[6] M.A. Faramarzi, H. Forootanfar, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **87**, 2011, 23.
[7] K.N. Thakkar, S.S. Mhatre, R.Y. Parikh, *Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine*, **6**, 2010, 57.
[8] N. Ahmad, *Green & Sustainable Chemistry*, **2**, 2012, 141.
[9] K.B. Narayanan, N. Sakthivel, *Advances in Colloid and Interface Science*, **169**, 2011, 59.
[10] Z.A. Ali, R. Yahya, S.D. Sekaran, R. Puteh, *Advances in Materials Science and Engineering*, **2016**, 2016, 6.
[11] K. Roy, C.K. Sarkar, C.K. Ghosh, *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, **9(3)**, 2014, 1137.
[12] G. Balaganesan, R. Velmurugan, *Latin American Journal of Solids and Structures*, **12**, 2015, 2259.
[۱۳] احسان رخشانی، عبدالحسین طاهری، "اصول سم شناسی (جلد دوم- قارچ کش‌ها، باکتری کش‌ها و نماتدکش‌های بیولوژیک)"، انتشارات فرهنگ جامع تهران، ۱۳۸۵.
[۱۴] کرامت‌الله ایزدپناه، سیدمحمد اشکان، ضیاءالدین بنی‌هاشمی، حشمت‌الله رحیمیان، واهه میناسیان "بیماری شناسی گیاهی (جلد ۲)"، انتشارات آییژ، ۱۳۸۹.
[15] T.J. White, T. Bruns, S. Lee, J. Taylor, M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White, "*Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*", Academic Press, San Diego, 1990.
[16] J.J. Doyle, J.L. Doyle, *Focus*, **12**, 1990, 13.
[17] H. Gandhi, *J. Nanomed Nanotechnol.*, **7**, 2016, 366.
[18] W.S. Abbott, *J. of Economic Entomolgy*, **18**, 1925, 265.
[19] A.K. Mittal, Y. Chisti, U.C. Banerjee, *Biotechnology Advances*, **31**, 2013, 346.
[20] J.R. Morones, L.J. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, B.J. Kouri, T.J. Ramirez, *Nanotechnology*, **16**, 2005, 2346.
[21] K. Divya, L.C. Kurian, S. Vijayan, M.S. Jisha, *J. Water Environ. Nanotechnol*, **1**, 2016, 63.
[22] H. Ahmad, K. Rajagopal, A. Hussain Shah, *Int. J. Nano Dimens*, **7**, 2016, 97.
[23] B. Basker, *Int. J. Curr. Res. Biosci. Plant Bio.*, **3**, 2016, 56.
[24] B. Vasihnavi, G. Rameshkumar, T. Rajagopal, *Global Journal of Biotechnology and Biochemistry*, **1**, 2015, 22.