

بررسی تأثیر برخی نانومواد در کنترل قارچ عامل بلایت شمشاد (*Calonectria pseudonaviculata*) در شرایط درون شیشه‌ای

الله‌وردی محمدزاده^۱ و حیده پیام‌نور^{۲*} و محمدرضا کاوسی^۳

۱- دانشجوی دکتری جنگل‌شناسی و اکولوژی جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
(Ecology2020@yahoo.com)

۲- دانشیار، گروه جنگل‌شناسی و اکولوژی جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
(Mnoori56@gmail.com)

۳- دانشیار، گروه جنگل‌شناسی و اکولوژی جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
(Kavosi.reza66@gmail.com)

تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۱/۱۹

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۷/۲۳

چکیده

در این پژوهش اثرهای برخی نانومواد (نانوسلولز، نانوکیتین، نانوکیتوزان، نانونقره و نانومس) در کنترل قارچ عامل بیماری در شرایط درون‌شیشه‌ای ارزیابی شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و در پنج غلظت (صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ پی‌پی‌ام) برای هر نانومواد انجام پذیرفت. نتایج نشان داد که کاربرد نانومواد با غلظت‌های ذکر شده در ممانعت از رشد میسلیم قارچ عامل بیماری معنی‌دار بوده و نانومواد تأثیر زیادی در کاهش رشد میسلیم داشته‌اند. نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که نانونقره بیشترین اثر و نانوسلولز کمترین اثر روی کاهش قطر پرگنه قارچ داشته‌اند. در بین غلظت‌های مختلف مورد آزمایش، غلظت ۲۰۰ پی‌پی‌ام بیشترین تأثیر را بر روی رشد پرگنه داشته و توانسته بیشینه بازدارندگی از رشد پرگنه قارچ را در پی داشته باشد همچنین غلظت ۵۰ پی‌پی‌ام، کمینه ممانعت از رشد میسلیم قارچ را نشان داد. همچنین نتایج نشان داد کاربرد غلظت‌های مختلف نانوسلولز و نانوکیتین عملاً تأثیر ناچیزی در ممانعت از رشد پرگنه قارچ را دارا هستند.

واژه‌های کلیدی: نانوذرات، بلایت شمشاد، جنگل‌های هیرکانی، *Calonectria pseudonaviculata*.

مقدمه

تحت عنوان *Cylindrocladium buxicola* معرفی شد (Rezaee et al., 2012). در پژوهشی دیگر، برای اولین بار به طور رسمی از ایران تلئومورف (فرم جنسی) بیماریگر بلایت شمشاد با نام *C. pseudonaviculata* معرفی شد (Mirabolfathy et al., 2013). نحوه ظهور علائم بلایت در اثر تولید فیتوتوکسین‌ها توسط عامل بیماریگر و یا ایجاد اختلال در سیستم‌های آوندی است. روی برگ‌ها لکه‌های تیره‌رنگ و در پشت آنها پوشش قارچی سفیدرنگ دیده می‌شود که به سرعت موجب خشکیدگی و ریزش شدید برگ‌ها می‌شود. عامل بیماری دارای چرخه‌های بیماری کوتاه و سریع بوده و هر چرخه بیماری در شرایط مناسب کمتر از یک هفته تکمیل می‌شود (Henricot and Gulham, 2002). استراتژی‌های مدیریت بیماری در پژوهش‌های اخیر شامل استفاده از ارقام و پایه‌های مقاوم به بیماری (Ganci et al., 2012, LaMondia, 2015, Shishkoff et al., 2015)، استفاده از قارچ‌کش‌ها (Henricot and Wedgwood, 2013, LaMondia, 2014, Baudoin et al., 2015)، عملیات بهداشتی (Dart et al., 2015, Shishkoff, 2016) و مهار زیستی (Kong and Hong, 2017) بوده است. همه این روش‌ها در مدیریت بیماری بلایت نقش دارند. در این بین از نانوذرات به عنوان یک روش مدیریتی برای کنترل این بیماری استفاده نشده است. فناوری نانو یکی از جذاب‌ترین علوم، به سرعت در حال پیشرفت بوده و می‌تواند در بسیاری از علوم مثل بیماری‌شناسی گیاهی تحول ایجاد کند. فناوری نانو علمی است که به شناسایی، تولید و استفاده از مواد در مقیاس نانومتر (10^{-9} متر) می‌پردازد. نانومواد و نانوذرات می‌توانند در مدیریت بیماری‌های گیاهی مورد استفاده قرار گیرند (Asadi and Jamali, 2017). از آنجاکه خواص فیزیکی و شیمیایی نانوذرات بسیار

گونه شمشاد جنگلی با نام علمی *Buxus sempervirens* subsp. *Hircana* از مهم‌ترین گونه‌های همیشه‌سبز اختصاصی جنگل‌های منطقه رویشی هیرکانی است. این گونه مختص ایران بوده و در بین ذخایر جنگلی جهان از اهمیت بالا و خاصی برخوردار است (Khazaeli et al., 2016). سطوح وسیعی از جنگل‌های شمشاد به علت تولید چوب با ارزش، در طول سالیان گذشته بهره‌برداری شده؛ و به صورت لکه‌های پراکنده دیده می‌شود. از طرفی در چند سال اخیر وجود قارچ عامل بیماری بلایت شمشاد (*Calonectria pseudonaviculata*) بحران جدی برای درختان شمشاد خزری ایجاد کرده است. پیشرفت و گسترش این بیماری خیلی سریع بوده به طوری که از سال ۱۳۹۱ تا ۱۳۹۷ در سطح وسیعی از رویشگاه‌های شمشاد استان‌های گیلان، مازندران و استان گلستان مشاهده شده و انتشار بیماری به سرعت از غرب به شرق هیرکانی گسترش یافته، به نحوی که مقدار آلودگی از سال ۱۳۹۱ تا ۱۳۹۴، ۱۵ هزار هکتار (Khazaeli et al., 2015) و از سال ۱۳۹۴ تا ۱۳۹۵ به بیش از ۴۰ هزار هکتار (Khazaeli et al., 2016) و از سال ۱۳۹۵ تا ۱۳۹۷ به بیش از ۶۰ هزار هکتار از رویشگاه‌های شمشاد رسیده است (مطالعات میدانی نویسندگان). در سال ۱۹۹۴ برای اولین بار علائم یک بیماری جدید روی درختان شمشاد در نهالستانی واقع در Hampshire انگلستان که موجب علائم سوختگی در گونه‌های شمشاد شده بود، مشاهده شد (Henricot et al., 2000, Gehesquiere et al., 2016). بلایت شمشاد در ایران اولین بار توسط Rezaee و همکاران (2012) از جنگل‌های لیره‌سر و جیسا در تنکابن استان مازندران گزارش شد. قارچ عامل بیماری بلایت با مشخصات ریخت‌شناسی آنامورف (فرم غیرجنسی)

2012). در پژوهشی در سال ۲۰۰۹ اثر ضد قارچی نانونقره بر روی قارچ *Candida spp* بررسی شد (Panacek et al., 2009). در پژوهش دیگری که در این زمینه انجام پذیرفت نشان داده شد که غلظت ۵ پی‌پی‌ام نانوذرات نقره بر روی سه قارچ بیماری‌زای گیاهی *Fusarium proliferatum*، *P. ultimum* و *Phytophthora sp* در شرایط آزمایشگاه بسیار مؤثر بود (Ashrafi et al., 2009). پژوهش‌های فراوانی در مورد اثرهای نانوذرات بر بسیاری از قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی مانند *Sclerotinia Alternariaalternata*، *Macrophomina phaseolina sclerotiorum* و *Botrytis cinerea Rhizoctonia solani* (Asadi and Jamali, 2017). با توجه به اینکه در زمینه بلایت شمشاد خزری پژوهشی انجام نشده است. هدف از این پژوهش ارزیابی اثرهای برخی نانومواد (نانوسولوز، نانوکیتین، نانوکیتوسان، نانونقره و نانومس) در کنترل قارچ عامل بیماری بلایت شمشاد در شرایط درون شیشه‌ای است.

مواد و روش‌ها

روش پژوهش

ارزیابی اثر نانومواد در ممانعت از رشد میسلیم قارچ عامل بیماری بلایت شمشاد در این آزمایش اثر پنج نانو ماده (نانوسولوز، نانوکیتوسان، نانوکیتین، نانونقره و نانومس) بر ممانعت از رشد میسلیم قارچ *C. pseudonaviculata* مورد بررسی قرار گرفت. جدایه قارچ از آزمایشگاه بیماری‌شناسی جنگل دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان-ایران تهیه شد. لازم به ذکر است قارچ بیمارگر دارای رشد بطئی و کندی روی محیط کشت است. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً

متفاوت از خواص ماکرو ذرات آن است، بنابراین تعیین تأثیر نانوذرات بر میکروارگانیسم‌ها در حفاظت از گیاه به‌ویژه در برابر عوامل بیمارگر گیاهی حائز اهمیت است. نانوذرات به خاطر اندازه بسیار کوچک (حتی کوچک‌تر از یک‌ذره ویروس) و واکنش‌پذیری بالا ممکن است بر فعالیت میکروارگانیسم‌ها تأثیرگذار باشد. پژوهش‌های فراوانی در رابطه با اثرهای نانوذرات در کنترل بسیاری از بیماری‌های گیاهی به-خصوص بیماری‌های قارچی در گیاهان زراعی و باغی انجام گرفته است. تأثیر ضد قارچی بیشتر نانونقره و نانومس نسبت به سموم قدیمی و رایج در کنترل بیماری لکه غربالی درختان میوه هسته‌دار به اثبات رسیده است (Mostafavi Neishaburi and Nasrollanejad, 2014). همچنین نشان داده شده است نانوکیتوزان با تأثیر بر بیان ژن و فعالیت آنزیم‌های مؤثر در القاء مقاومت به بلایت فوزاریومی خوشه گندم مقاومت گیاهان را علیه قارچ‌های بیماری‌زا تحت تأثیر قرار می‌دهد (Ghazimohseni and Sabbagh, 2016). در پژوهشی دیگر در بررسی اثر نانونقره در کنترل قارچ‌های *Phoma betae* و *Pythium ultimum* در شرایط آزمایشگاهی این نانوذره به‌طور معنی‌داری در جلوگیری از رشد دو قارچ نامبرده مؤثر بوده و دارای فعالیت قارچ ایستایی در غلظت ۶۰ پی‌پی‌ام است (Kakuei Nezhad et al., 2012). اثرهای بازدارندگی نانوذرات (روی، مس، نقره و مخلوط نقره و مس) با غلظت‌های ۰، ۲۵، ۷۵، ۱۰۰ پی‌پی‌ام روی نرخ رشد قارچ *Pythium aphanidermatum* بررسی شد و نتایج نشان داد که عمده اثرهای بازدارندگی از غلظت‌های ۷۵ و ۱۰۰ پی‌پی‌ام در تمامی تیمارها به-دست می‌آید، همچنین بیش‌ترین بازدارندگی نرخ رشد میسلیم مربوط به تیمار مس و مخلوط روی و مس در مقایسه با دیگر تیمارها بود (Kermanian et al.,)

تجزیه و تحلیل آماری

تمامی مراحل تجزیه و تحلیل آماری در محیط نرم افزار SPSS نسخه ۲۵ انجام پذیرفت. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو عامل نانومواد در پنج سطح و غلظت‌های مختلف نانومواد در پنج سطح و در سه تکرار انجام پذیرفت. به منظور اثبات وجود تفاوت معنی‌دار بین اثر کنترلی تیمارهای مورد آزمایش تحت تأثیر غلظت‌های مختلف نانومواد، جدول تجزیه واریانس رسم شد. تجزیه واریانس از طریق روش GLM انجام شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چنددامنه‌ای دانکن استفاده شد.

نتایج

تأثیر نانومواد بر رشد قارچ بیمارگر

نتایج نشان داد که اثر پنج نانوماده با پنج غلظت مورد آزمایش در ممانعت از رشد میسلیم قارچ عامل بلایت شمشاد در سطح ۵ درصد معنی‌دار بوده و نانومواد بکار رفته شده تأثیر زیادی در کاهش رشد میسلیم قارچ مورد آزمایش داشته است (جدول ۱).

تصادفی در سه تکرار و برای هر نانومواد پنج غلظت (صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ پی‌پی‌ام) انجام شد. ابتدا با توجه به درصد ماده مؤثره هر نانوماده، غلظت‌های صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ پی‌پی‌ام برای تمامی نانوماده تهیه شد. سپس ۱۸ میلی‌لیتر محیط کشت سیب‌زمینی آگار دکستروز (PDA) (مقدار ۲۰۰ گرم عصاره سیب‌زمینی، ۱۶ گرم آگار و ۲۰ گرم دکستروز در یک لیتر آب) در داخل لوله‌های آزمایش و در قالب ۳ تکرار تهیه شد. لوله‌های آزمایش به همراه محیط کشت پس از سترون شدن در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۱/۵ اتمسفر به تشتک‌های حاوی ۲ میلی‌لیتر از غلظت‌های هر نانوماده به روش اختلاط با محیط کشت (Horsfall *et al.*, 1940) منتقل و به‌خوبی با سوسپانسیون نانومواد مخلوط شد. برای بررسی تیمار شاهد، ۲ میلی‌لیتر آب مقطر سترون با محیط کشت PDA مخلوط شد. سپس از پرگنه قارچ یک حلقه میسلیمی به قطر ۵ میلی‌متر در وسط هر تشتک کشت و تشتک‌ها در دمای 25 ± 1 در انکوباتور نگهداری شدند. پس از ۲۵ روز، اندازه‌گیری قطر پرگنه در دو برای عمود بر هم انجام شد.

جدول ۱- تجزیه واریانس ارزیابی اثر نانومواد در ممانعت از رشد میسلیم قارچ بلایت شمشاد

Table 1. Analysis of variance on evaluation of nanomaterials effects on mycelial growth of Box blight

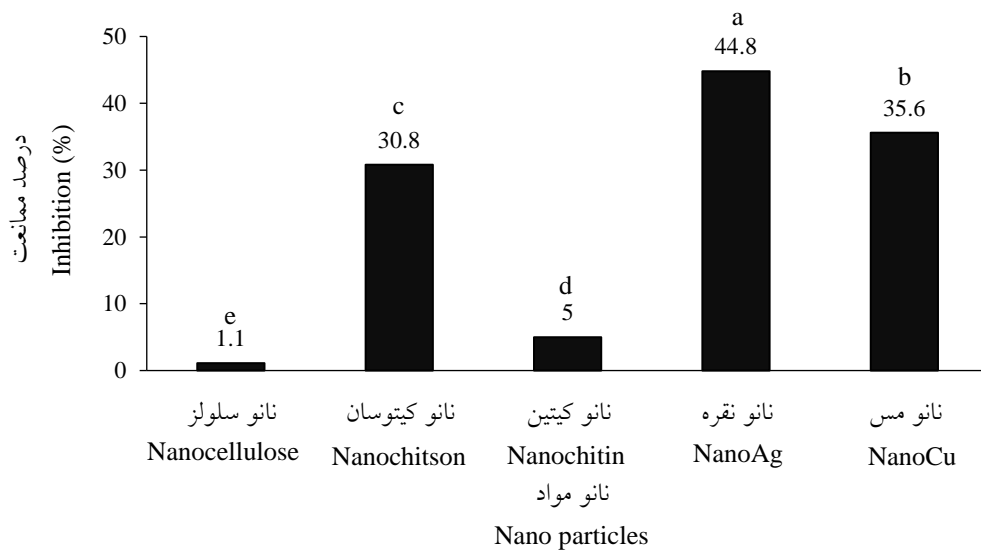
Sig.	F	میانگین مربعات Mean Square	درجه آزادی df	مجموع مربعات Sum of Squares	منابع تغییرات Sources of variation
.000**	6166.4	5604.3	4	22417.4	نانومواد Nano Particles
.000**	8859.9	5416.9	4	21667.6	غلظت Concentration
.000**	1560	953.8	16	15260.6	نان مواد × غلظت Nano Particles × Concentration
		.611	50	30.6	خطا error

** Significant at 1% level

** معنی‌داری در سطح ۱ درصد.

پرگنه قارچ بلایت شمشاد را داشته است (۱/۱ درصد به‌طور میانگین در تمامی غلظت‌ها). پس از ترکیب نانونقره، نانومس (۳۵/۶ درصد)، نانوکیتوزان (۳۰/۸ درصد) و نانوکیتین (۵ درصد) توانستند به‌ترتیب رشد میسلیم قارچ بلایت شمشاد را کاهش دهند (شکل ۱، شکل ۳).

نتایج مقایسه میانگین اثر پنج نانوماده در ممانعت از رشد میسلیم قارچ بلایت شمشاد (آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد) نشان داد که نانونقره بیشترین اثر را روی کاهش رشد پرگنه قارچ داشت (۴۴/۹ درصد، به‌طور میانگین در تمامی غلظت‌ها). در صورتی‌که نانوسلولز کمترین اثر روی کاهش قطر

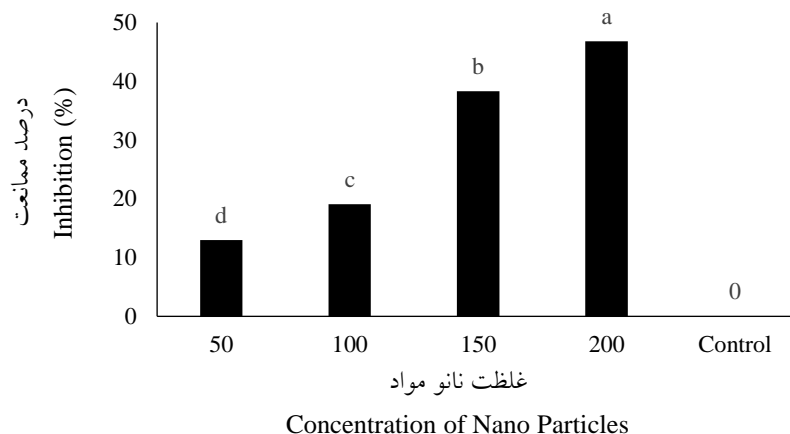


شکل ۱- درصد ممانعت از رشد پرگنه قارچ بیماری بلایت شمشاد تحت تأثیر نانومواد مختلف

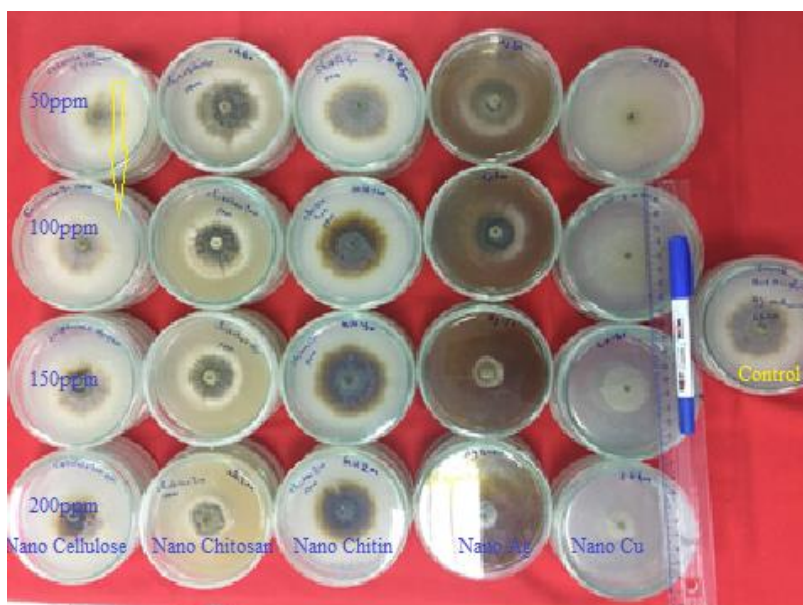
Figure 1. Percentage inhibitory growth of Box blight colonies by different nanomaterials

غلظت ۵۰ پی‌پی‌ام دارای کمینه ممانعت از رشد میسلیم (۱۳ درصد) بود. اختلاف کم بین غلظت ۵۰ پی‌پی‌ام و غلظت صفر (کنترل) نشان می‌دهد که غلظت پایین نانوماده تأثیر فراوانی در جلوگیری از رشد میسلیم را دارا نیست. البته همان‌طور که انتظار می‌رود با افزایش مقدار غلظت نانومواد مقدار تأثیر آن در ممانعت از رشد پرگنه قارچ افزایش می‌یابد. لازم به ذکر است که غلظت ۱۵۰ پی‌پی‌ام هم توانسته به اندازه ۳۸/۳ درصد از رشد پرگنه قارچ جلوگیری کند (شکل ۲، شکل ۳).

همچنین نتایج نشان داد که اثر پنج غلظت نانومواد مورد آزمایش در ممانعت از رشد میسلیم قارچ بلایت شمشاد بسیار معنی‌دار بوده و غلظت‌های به‌کار رفته شده تأثیر زیادی در کاهش رشد میسلیم قارچ مورد آزمایش داشته‌اند (جدول ۱). مقایسه میانگین اثرهای پنج غلظت نانوماده در ممانعت از رشد پرگنه قارچ عامل بیماری نشان داد که در بین غلظت‌های مورد بررسی غلظت ۲۰۰ پی‌پی‌ام بر روی رشد پرگنه قارچ بلایت بیشترین تأثیر بازدارندگی (۴۶/۸ درصد به‌طور میانگین در تمامی نانومواد) داشته و



شکل ۲- درصد ممانعت از رشد پرگنه قارچ بیماری بلایت شمشاد تحت تأثیر غلظت‌های مختلف نانو مواد
 Figure 2. Percentage inhibitory growth of Box blight colonies by different concentrations of nanoparticles



شکل ۳- اثرهای نانو مواد به همراه غلظت‌های مختلف و نمونه شاهد در ممانعت از رشد قارچ عامل بلایت شمشاد
 Figure 3. Effects of different nanoparticles with different concentrations and control on growth inhibition of in Box blight fungus

قابل توجهی مانع از رشد قارچ می‌شوند. از طرفی کاربرد غلظت‌های مختلف نانوسلولز و نانوکیتین عملاً تأثیر بسیار ناچیزی در ممانعت از رشد پرگنه قارچ عامل بیماری داشته است (جدول ۲). در این بین، نانومس، نانونقره و نانوکیتوزان توانستند در غلظت ۲۰۰ پی‌پی‌ام به ترتیب ۸۳/۱ درصد، ۷۸/۸ درصد و ۶۴/۹ درصد سبب ممانعت از رشد قارچ شوند.

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که اثرهای متقابل نانو مواد، غلظت نانو مواد و اثرهای متقابل در غلظت در بازدارندگی از رشد میسلیم قارچ عامل بیماری معنی‌دار است. نتایج اثرهای متقابل نیز نشان داد که غلظت‌های بالاتر از ۱۵۰ پی‌پی‌ام نانوکیتوزان، نانونقره و نانومس نسبت به غلظت‌های پایین‌تر بر کاهش رشد پرگنه بسیار مؤثر بوده و به‌طور

پس از آن نانونقره و نانومس در غلظت ۱۵۰ پی پی ام به- ترتیب ۷۶/۸ درصد و ۶۵/۸ درصد از رشد قارچ جلوگیری کردند. این درحالی است که نانوسلولز و نانوکیتین در غلظت‌های مختلف سبب ممانعت رشد قارچ نشدند (جدول ۲).

جدول ۲- نتایج ارزیابی اثر پنج نانو ماده در پنج غلظت مختلف بر ممانعت از رشد پرگنه قارچ عامل بلایت شمشاد (درصد)

Table 2. Evaluation results of the effect of five nanoparticles with different concentrations on colony growth inhibition of Box blight fungus (in percent)

غلظت نانومواد (پی پی ام)					نانومواد
Concentration of Nano Particles (ppm)					Nano Particles
200	150	100	50	کنترل Control	
1	1	1	2.5	0	نانوسلولز Nano cellulose
64.9	41.9	33.9	13.3	0	نانوکیتوزان Nano chitosan
7.2	5.8	5.5	6.4	0	نانوکیتین Nano chitin
78.8	76.8	36.2	32.6	0	نانونقره Nano Ag
83.1	65.8	18.9	10	0	نانومس Nano Cu

بحث

دیگر موجودات زنده نشده و سریع از جریان بدن خارج می‌شوند. یکی از دلایل کاربرد گسترده این ذرات این است که نانوذرات برای عوامل بیماری‌زا یک سم تلقی می‌شوند، همچنین این ذرات بر سوخت‌وساز، تنفس و تولیدمثل ریز سازواره‌ها اثر می‌گذارند (Zhang and Sun, 2007). در سال‌های اخیر با کشف فن‌آوری نانو، امیدهای فراوانی برای کم کردن مصرف مواد شیمیایی و داشتن محیطی سالم را ایجاد کرده است. بنابراین فناوری نانو یکی از جذاب‌ترین علوم است که به سرعت در حال پیشرفت بوده و می‌تواند در بسیاری از علوم مثل بیماری‌شناسی گیاهی انقلاب ایجاد کند (Asadi and Jamali, 2017). بیماری‌های گیاهی به دلیل خسارتی که به گیاهان وارد می‌کنند، سبب کاهش محصول و کاهش کمیت و کیفیت محصول و نابودی درختان جنگلی می‌شوند.

در راستای تحولات اخیر زندگی انسان، علم نانو تکنولوژی هم توسعه یافته و تقریباً در همه رشته‌های علمی، نشانه‌هایی از آن یافت می‌شود. نانو تکنولوژی به معنای دست‌کاری دقیق و کنترل شده ساختار اتمی یا مولکولی مواد در مقیاس نانومتر به- منظور تهیه ریز ذراتی با کاربردهای خاص است که حداقل یکی از ابعاد آنها کمتر از ۱۰۰ نانومتر است. فناوری نانو، طراحی، تولید و کاربرد ساختار ابزار و سیستم‌ها در مقیاس نانو محسوب می‌شود (Usha et al., 2012). نانو ذرات دارای نسبت سطح به حجم بیشتری در مقایسه با میکروذرات بوده که سبب افزایش سطح فعال و رهایش کنترل شده آنها می‌شود. همچنین مزیت دیگر نانومتری بودن ذرات این است که این ترکیبات سبب تحریک سیستم ایمنی بدن انسان و

Rahnama, 2007). در پژوهشی دیگر در بررسی اثر نانونقره در کنترل قارچ‌های *Phoma betae* و *P. ultimum* در شرایط آزمایشگاهی این نانوذره به‌طور معنی‌داری در جلوگیری از رشد دو قارچ نامبرده مؤثر بوده و دارای فعالیت قارچ‌ایستایی در غلظت ۶۰ پی‌پی‌ام بود (Kakuei Nezhad et al., 2012). اثرهای بازدارندگی نانوذرات روی، مس، نقره و مخلوط نقره و مس با غلظت‌های ۰، ۲۵، ۷۵، ۱۰۰ پی‌پی‌ام روی نرخ رشد قارچ *P. aphanidermatum* بررسی شد و نتایج نشان داد که عمده اثرهای بازدارندگی در غلظت‌های ۷۵ و ۱۰۰ پی‌پی‌ام در تمامی تیمارها به‌دست می‌آید. همچنین بیش‌ترین بازدارندگی از نرخ رشد میسلیوم مربوط به تیمار مس و مخلوط روی و مس در مقایسه با دیگر تیمارها بود (Kermanian et al., 2012). در پژوهشی دیگر تأثیر نانوذرات نقره بر روی سه قارچ بیماری‌زای گیاهی *Fusarium proliferatum* و *Phytophthora.P.ultimum* در شرایط آزمایشگاه نشان داد که غلظت ۵ پی‌پی‌ام بهترین تأثیر را روی این سه قارچ دارد (Ashrafi et al., 2009). در مورد مکانیسم عمل نانوذرات نقره می‌توان اشاره گفت که نانوذرات از طریق رخنه و نفوذ به دیواره سلولی میکروارگانیسم‌ها سبب ایجاد تغییرات عمده در غشای سلولی و افزایش نفوذپذیری غشاء شده و در نهایت منجر به مرگ سلولی می‌شود. یون‌های نقره تمایل شدید به برقراری ارتباط با گروه فسفری در آنزیم‌های حیاتی را داشته و در نتیجه تقابل با DNA سبب جلوگیری از تقسیم سلولی، همانندسازی DNA و در نهایت منجر به مرگ سلولی می‌شوند (Asadi and Jamali, 2017). نانوذرات مس نیز دارای خاصیت ضد میکروبی هستند. نانوذرات مس با آزادکردن کاتیون‌های مس به باندهای سولفیدریل موجود در پروتئین‌های مختلف سلول

روش‌های مبارزه با بیماری‌های گیاهی بسیار متنوع است و بستگی به عامل بیماری، نوع میزبان و انفعالات این دو دارد. نتایج این پژوهش نشان داد که اثر پنج نانومواد با پنج غلظت مورد آزمایش در ممانعت از رشد میسلیوم قارچ عامل بلایت شمشاد بسیار معنی‌دار بوده و نانوماده بکاررفته‌شده تأثیر زیادی در کاهش رشد میسلیوم قارچ مورد آزمایش داشته است. نتایج مقایسه میانگین اثر پنج نانوماده در ممانعت از رشد میسلیوم قارچ (آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد) نشان داد که نانونقره بیشترین اثر را روی کاهش رشد پرگنه قارچی داشته و نانوسلولز کمترین اثر را دارد. پس از ترکیب نانونقره، نانومس، نانوکیتوزان و نانوکیتین توانستند به‌ترتیب رشد میسلیوم قارچ عامل بیماری را کاهش دهند. نانومس و نانونقره از مواد مؤثر و پرمصرف در کشاورزی شناخته شده‌اند، در پژوهش‌های بسیاری خواص ضد قارچی و ضد باکتریایی نانوذرات مورد بررسی قرار گرفته است (Mostafavi Neishaburi and Nasrollanejad, 2014). نتایج بررسی قابلیت ضد قارچی نانوذرات نقره بر رشد میسلیومی قارچ *Aspergillus flavus* در شرایط درون شیشه‌ای نشان داد که این نانوذره بسته به غلظت مورد استفاده، به‌طور فراوانی از رشد قارچ جلوگیری می‌کند، نانونقره در غلظت ۵۰۰ پی‌پی‌ام مؤثر بوده و تا ۵۰ درصد بازدارندگی رشد به‌دنبال داشت، بررسی مقدار رشد قارچ در محیط جامد نیز نشان داد که در روز اول نسبت به روزهای بعد مدار کنترل بیش‌تر بود (Rostami et al., 2011). در بررسی اثر نانونقره بر روی رشد قارچ *Fusarium moniliforme* مشخص شد که تیمارهای ۲۰ پی‌پی‌ام سبب کاهش ۵۰ درصدی رشد ریشه‌های قارچ پس از ۴ روز شده است و نیز خاصیت بازدارندگی نانونقره علیه عامل بیماری نشان داده شد (Katuli and

رشد و نمو قارچ مانند تولید هاگ، زنده‌مانی هاگ و جوانه‌زنی مشاهده شده است (Kaur et al., 2012).

نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد که اثر پنج نانوماده با غلظت‌های مورد آزمایش در ممانعت از رشد میسلیم قارچ عامل بلایت شمشاد معنی‌دار بوده و نانومواد بکاررفته تأثیر زیادی در کاهش رشد میسلیم قارچ مورد آزمایش داشته است. به طوری که نانوقره بیشترین و نانوسولز کمترین اثر را نشان دادند. همچنین نتایج مقایسه میانگین اثرهای پنج غلظت نانومواد نشان داد که در بین غلظت‌های مختلف مورد بررسی غلظت ۲۰۰ و ۵۰ پی‌پی‌ام به ترتیب بیشترین و کمترین تأثیر را در ممانعت از رشد پرگنه قارچ عامل بیماری داشتند. همچنین نتایج نشان داد که کاربرد غلظت‌های مختلف نانوسولز و نانوکیتوزان عملاً تأثیر چندانی در ممانعت از رشد پرگنه قارچ نداشته است. نانومس، نانوقره و نانوکیتوزان توانستند در غلظت ۲۰۰ پی‌پی‌ام به ترتیب ۸۳/۱ درصد، ۷۸/۸ درصد و ۶۴/۹ درصد از رشد قارچ جلوگیری کنند؛ بنابراین نانوکیتوزان، نانوقره و نانومس می‌توانند برای مدیریت بیماری بلایت شمشاد به کار گرفته شوند. در پایان باید اشاره کرد که بیشتر عوامل کنترل‌کننده بیماری جنبه حفاظتی داشته و هیچ‌کدام به طور کامل سبب درمان گیاه آلوده نمی‌شوند. به همین دلیل پس از سپری شدن سال‌ها از معرفی روش‌های مختلف کنترل، جامعه جهانی هنوز به دنبال روش‌های ایمن‌تر، مؤثرتر، آسان‌تر و کم‌هزینه‌تر مبارزه با بیماری‌های گیاهان است. در این راستا بیماری‌شناسان گیاهی در سرتاسر دنیا، ضمن ارائه سیستم‌های مدیریت مبارزه تلفیقی، در این نظر متفق‌القول‌اند که هدف نهایی این روش‌ها، مهار کامل بیماری‌ها نیست و تنها کاهش اقتصادی خسارت ناشی از بیماری‌ها با حداقل خسارت به محیط‌زیست مدنظر است. از این رو

قارچی و باکتریایی مانند پروتئین‌های آنزیمی و سطحی غشا متصل شده و با ایجاد تغییراتی در ساختار این پروتئین‌ها آنها را غیرفعال کرده و به دنبال آن واکنش‌های مهم آنزیمی و نیز خاصیت نفوذپذیری غشای سلولی با اختلال مواجه شده و در نهایت مرگ سلول باکتری و قارچ می‌شوند (Soltani et al., 2018). در این پژوهش نتایج نشان داد که غلظت‌های بالاتر از ۱۵۰ پی‌پی‌ام در نانوکیتوزان، نانوقره و نانومس نسبت به غلظت‌های پایین بر کاهش رشد پرگنه بسیار مؤثرند و به طور قابل توجهی مانع از رشد می‌گردند، ولی کاربرد غلظت‌های مختلف نانوسولز و نانوکیتوزان عملاً تأثیر بسیار ناچیزی در ممانعت از رشد پرگنه قارچ عامل بیماری داشته است. نانومس، نانوقره و نانوکیتوزان توانستند در غلظت ۲۰۰ پی‌پی‌ام به ترتیب ۸۳/۱ درصد، ۷۸/۸ درصد و ۶۴/۹ درصد از رشد قارچ عامل بیماری جلوگیری کنند. در مورد چگونگی عملکرد ضد قارچی کیتوزان سه دیدگاه وجود دارد: ۱- تعامل بار مثبت کیتوزان با بار منفی فسفولیپید غشاء سلولی قارچ‌ها که به نوبه خود نفوذپذیری غشاء پلاسمایی سلول را تغییر داده و سبب نشت محتویات سلولی و در نهایت منجر به مرگ سلول می‌شود. ۲- متصل شدن کیتوزان به عناصر کمیاب که سبب غیرقابل دسترس بودن مواد مغذی ضروری و در نهایت توقف رشد طبیعی قارچ می‌شود. ۳- نفوذ کیتوزان به دیواره سلولی قارچ و اتصال به DNA و مهار سنتز mRNA که به نوبه خود تولید پروتئین‌های ضروری و آنزیم‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد؛ بنابراین مکانیسمی که برای فعالیت ضد قارچی نانوکیتوزان بیان شده است به طور عمده بر تأثیر نانوکیتوزان بر دیواره سلولی قارچ و غشاء آن است. اثر بازدارندگی نانوکیتوزان بر مراحل مختلف

امیدبخش بوده و نیاز به آن یک ضرورت محسوب می‌شود.

به جرأت می‌توان گفت که استفاده از روش‌های ایمن‌تر و سالم‌تر برای کنترل بیماری‌های درختان جنگلی مانند استفاده از نانومواد و نانوذرات یک پدیده

References

- Asadi, S, Z & S. Jamali, 2017. The Role of Nanotechnology in Plant Disease Management, *Journal of Agricultural Engineering and Natural Resources Engineering*, 56 (4): 40-44. (In Persian)
- Ashrafi, S.J., M. Rastegar, B. Jaafarpur, N. Shahtahmasebi & S.A. Kumar, 2009. Effects of Nanosilver particle on growth of 3 fungus *in vitro*. In: Proceeding of the Secondary Application of Nanotechnology to Agriculture Congress. Iran, Tehran. (In Persian)
- Baudoin, A., H.F. Avenot, T. Edwards, Y. Diallo & C. Lucernoni, 2015. Evaluation of fungicides for control of boxwood blight, *Plant Disease Management*. Rep. 9, OT006.
- Dart, N.L., C. Allen & C.X. Hong, 2015. Efficacy of bleach and ethanol as sanitizers on the boxwood blight pathogen, *Calonectria pseudonaviculata*. Va. Nurs. Landsc. Assoc. Newsl. 85, 46e47.
- Ganci, M., D.M. Bensasson & K. Ivors, 2012. Susceptibility of commercial boxwood taxa to *Cylindrocladium buxicola*. *Acta Hort.* 1014, 369e370.
- Gehesquière, B., J.A. Crouch, R.E. Marra, K. Van Poucke, F. Rys, M. Maes, & K. Heungens, 2016. Characterization and taxonomic reassessment of the box blight pathogen *Calonectria pseudonaviculata*, introducing *Calonectria henricotiae* sp. Nov. *Plant Pathology*, 65(1), 37-52.
- Ghazimohseni, V & S.K. Sabbagh, 2016. Effect of chitosan on gene expression and activity of enzymes involved in resistant induction to fusarium of wheat, *Iranian Journal of Plant Protection*, 46(2): 363-373. (In Persian)
- Henricot, B., A. Pérez Sierra & C. Prior, 2000. A new blight disease on Buxus in the UK caused by the fungus *Cylindrocladium*. *Plant Pathology*, 49(6): 805-805.
- Henricot, B., & A. Culham, 2002. *Cylindrocladium buxicola*, a new species affecting *Buxus spp.*, and its phylogenetic status. *Mycologia*, 94(6), 980-997.
- Henricot, B & E. Wedgwood, 2013. Evaluation of foliar fungicide sprays for the control of boxwood blight, caused by the fungus *Cylindrocladium buxicola*. *Plant Health Progress*. Online. <http://dx.doi.org/10.1094/PHP-2013-1024-01-RS>.
- Kakuei Nezhad, M., S. Bahrami & M. Abdollahian-Noghabi, 2012. Effects of Nanosilver and Titanium Dioxide on inhibition of *Pythium ultimum* and *Phoma betae in vitro* conditions. In: Proceeding of the 20th Iranian Plant Protection Congress. Shiraz, Iran. pp. 85. (In Persian)
- Katuli, N & K. Rahnama, 2007. The effects of nano silver on growth of mycelia fungus *Fusarium moniliforme* the causal agent of rice and maize head and root rot. *Jurnal Plant Protection*. Food. 1: 6-14.
- Kaur, P., R. Thakur & A. Choudhary, 2012. An in vitro study of the antifungal activity of silver/chitosan nanoformulations against important seed borne pathogens. *Int J Sci Technol Res*, 1, pp.83-86.
- Kermanian, S., M.J. Solaimai & J. Soltani, 2012. Comparative efficacy of the antimicrobial activity of nanoparticle (Zn, Cu and Ag) against *cucumber pythium* root rot. In: Proceeding of the 20th Iranian Plant Protection Congress. Shiraz, Iran. pp. 138. (In Persian)
- Khazaeli, P., Rezaee, S. Mirabolfathy, M. Zamanizade H and Kia-daliri, H., 2015. Report of Boxwood blight extension to Golestan province forests, *Entomology and Phytopathology*, 83 (1): 85-86. (In Persian)
- Khazaeli, P., S. Rezaee, M. Mirabolfathi, H. Zamanizadeh & H. Kiadeliri, 2016. Distribution, specific detection and the pathogenesis variation of *Calonectria pseudonaviculata* isolates, causal agent of boxwood blight disease, in Hyrcanian forest of Iran, *Entomology and Phytopathology*, 84 (1): 141-156. (In Persian)
- Kong, P & C. Hong, 2017. Biocontrol of boxwood blight by *Trichoderma koningiopsis* Mb2. *Crop Protection*, 98, 124-127.
- LaMondia, J.A., 2014. Fungicide efficacy against *Calonectria pseudonaviculata*, causal agent of boxwood blight. *Journal of Plant Disease*. 98, 99e102.

- LaMondia, J.A., 2015. Management of *Calonectria pseudonaviculata* in boxwood with fungicides and less susceptible host species and varieties. *Journal of Plant Disease*. 99(3), 363-369.
- Mirabolfathy, M., Y. Ahangaran, L. Lombard & P.W. Crous, 2013. Leaf blight of *Buxus sempervirens* in northern forests of Iran caused by *Calonectria pseudonaviculata*. *Journal of Plant Disease*, 97(8):1121-1122. <http://apsjournals.apsnet.org/loi/pdis>
- Mosdafavi Neshaburi, F.S & S. Nasrohanejad, 2014. Comparison of two nano fungicides with common fungicides to control shot hole disease of fruit trees, *Journa Plant Production Research*, 21(2): 153-163. (In Persian)
- Panacek, A., M. Kolar, R. Vecerova, R. Prucek, J. Soukupova, V. Krystof, P. Hamal, R. Zboril & L. Kvitek, 2009. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. *Biomaterials*. 30: 31. 6333-6340.
- Rostami, F., S. Molaii, E. Sedaghati & H. Alaii, 2011. Survey of Antifungal potential of silver-zinc nanoparticles on the growth of fungal mycelium of *Aspergillus flavus* in vitro. In: Proceeding of the First National Conference on Modern Agricultural Sciences and Technologies. Iran, Zanjan. (In Persian)
- Rezaee, S., H. Kia-daliri, K. Sharif, Y. Ahangaran & S. Hajmansoor, 2012. Boxwood blight caused by *Cylindrocladium buxicola* in Tonekabon forest. *Entomology and Phytopathology*, 80 (2): 197-198. (In Persian)
- Shishkoff, N., 2016. Survival of microsclerotia of *Calonectria pseudonaviculata* and *C. henricotiae* exposed to sanitizers. *Plant Health Progress*. Online. [http:// dx.doi.org/10.1094/PHPRSe15e0038](http://dx.doi.org/10.1094/PHPRSe15e0038).
- Shishkoff, N., M. Daughtrey, S. Aker & R.T. Olsen, 2015. Evaluating boxwood susceptibility to *Calonectria pseudonaviculata* using cuttings from the national boxwood collection. *Plant Health Progress*. Online. <http://dx.doi.org/10.1094/PHPRS-14e0033>.
- Soltani, H & R. Shokri, 2018. The Antifungal Effect of Silver, Copper Nanoparticles, and Their Combination and in combination with Amphotericin B against *Candida albicans* In Vitro and in Animal Model, *Qom University Medicence Science*, 11(12): 17-24
- Usha, R., E. Prabu, M. Palaniswamy, C.K. Venil & R. Rajendran, 2010. Synthesis of metal oxide nano particles by *Streptomyces* sp for development of antimicrobial textiles. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*. 5: 3. 153-160.
- Zhang, Y. Y., & J. Sun, 2007. A study on the bio-safety for nano-silver as anti-bacterial materials. *Zhongguo yi liao qi xie za zhi= Chinese journal of medical instrumentation*, 31(1), 36-8.

Study of the effect of some nanoparticles on control of the agent of *Calonectria pseudonaviculata* under In Vitro conditions

A. Mohamadzadeh¹ V. Payam Noor^{*2} and M.R, Kavosi³

1- PhD. Student of Silviculture and Forest Ecology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Recourses, Gorgan, I. R. Iran. (ecology2020@yahoo.com)

2- Associate Professor, Department of Forest Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Recourses, Gorgan, I. R. Iran. (mnoori56@gmail.com)

3- Associate Professor, Department of Forest Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Recourses, Gorgan, I. R. Iran. (kavosi.reza66@gmail.com)

Received: 15.10.2018

Accepted: 08.04.2019

Abstract

The purpose of this study was evaluation the effects of nanoparticles (nano-cellulose, nano-chitin, nano-chitosan, nano-silver and nano-copper) on the control of disease fungal agent in-vitro conditions. Factorial experiment was carried out in a completely randomized design with three replicates and five concentrations (0, 50, 100, 150 and 200 ppm) for each nanoparticles. Results showed that the using of nanoparticles with the mentioned concentrations in inhibiting the growth of mycelium fungi was significant in box blight and nanoparticles had a significant effect on the growth of mycelial fungi growth. The results of comparison of meanings showed that nano-silver had the most effect and nanocellulose had the least effect on reducing the colonization diameter of fungi. Among the various concentrations tested, the concentration of 200 ppm had the highest effect on the growth of the colony of the fungus, while the concentration of 50 ppm has the least inhibitory growth of of the colony of the fungus. The results showed that application of different concentrations of nano-cellulose and nano-chitin had little effect on inhibiting the growth of colony of fungus caused by *Calonectria pseudonaviculata*. Meanwhile, nano-copper, nano-silver and nano-chitosan were able to inhibit growth of 200 ppm in 83.1%, 78.8% and 64.9%, respectively. Results showed that using nanoparticles with mentioned concentrations had significant inhibitory effects on fungal mycelial growth. The results of mean comparison showed that nano-silver had the most effect and nano-cellulose had the least effect on reducing fungal colony diameter. 200 ppm concentration had the highest effect with maximum fungal growth inhibition. On the other hand, 50 ppm concentration showed the least inhibitory effect on fungal mycelial growth. The results showed that using of nano-cellulose and nano-chitin different concentrations had little effect on fungal colony growth inhibition.

Keywords: Box blight, *Calonectria pseudonaviculata*, Hyrcani forests, Nanoparticles.

* Corresponding author

Tel: +989111719613