بررسی اثرنانوسیلور برروی رشد ریسه های قارچ *Fusarium moniliforme* عامل بیماری پوسیدگی خوشه وطوقه ذرّت وبرنج

نفیسه کتولی[1] و کامران رهنما[2]

به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی‌ارشد و دانشیارگروه گیاهپزشکی دانشکده علوم زراعی

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

*پست الکترونیک: Kamran_ra@yahoo.com

چکیده

به‌منظور بررسی تأثیر ماده نانوسیلورو تعیین غلظت موثراین ماده برروی قارچ *Fusarium moniliforme* عامل پوسیدگی طوقه برنج، پوسیدگی ساقه ریشه و دانه ذرت دو آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در آزمایشگاه به اجرا در آمد. در آزمایش اول دوزهای مختلف نانوسیلور مایع ۲۰۰L که شامل: شاهد بدون نانوسیلور، سایر تیمارها به‌ترتیب ۵ppm، ۱۰ppm، ۳۰ppm، ۵۰ppm و ۱۰۰ppm نانوسیلور در ۳ تکرار به‌منظور تعیین محدوده دوز نانوسیلور انجام شد. این ماده با محیط کشت PDA پس از سترون شدن مخلوط گردید. نتایج نشان داد که از دوز ۳۰ppm به بعد در بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری در سطح p=۰/۰۵ وجود دارد. در مرحله دوم آزمایش برای اطمینان بیشتر از تاثیر سایر دوزها آزمایش با مقادیر انتخاب شده عبارتند از: شاهد بدون نانوسیلور، تیمار اول ۲۰ppm، تیمار دوم ppm ۲۵، تیمار سومppm ۳۵، تیمار چهارم ٤۰ppm و تیمار پنجم ٦۰ppm در ۳ تکرار و همانند آزمایش اول تکرار گردید. نتایج نشان داد که از تیمار ۲۰ppm به بعد حدود ۵۰ درصد یا حتی بیشتر کاهش رشد قطر ریسه‌های فوزاریوم پس از چهار روز قابل مشاهده بود که در زمان کوتاه نانوسیلور کاهش چشمگیری در رشد ریسه‌های این قارچ داشته است، بنابراین نانوسیلورها علاوه بر خاصیت آنتی باکتریال، احتمالاً به نسبت بالایی خاصیت بازدارندگی بر علیه عامل بیمارگرگیاهی را نیز دارند.

واژه‌های کلیدی: نانوسیلور، قارچ *Fusarium moniliforme*، کاهش قطرریسه فوزاریوم

مقدمه

فن‌آوری نانو اساساً توانایی کار در سطح مولکولی، اتم اتم، برای ایجاد ساختارهای بزرگ و کاملاً نو باسازماندهی مولکولی است. رفتار مولکول‌های منفردیک نانومتری (10^{-9}متری) یا رفتار ساختارها در محدوده 10^{-9} تا 10^{-7} در مقایسه با مواد حجیم بسیار متفاوت است (۵). به‌عبارتی نانو تکنولوژی توانمندی تولید مواد، ابزار و سیستم‌های جدید با در دست گرفتن کنترل در سطوح مولکولی و اتمی و استفاده از خواصی است که در آن سطح ظاهر می‌شود (۳) و (٤)، در یک تقسیم‌بندی کلی فناوری نانو به ۳ شاخه تقسیم می‌شود:

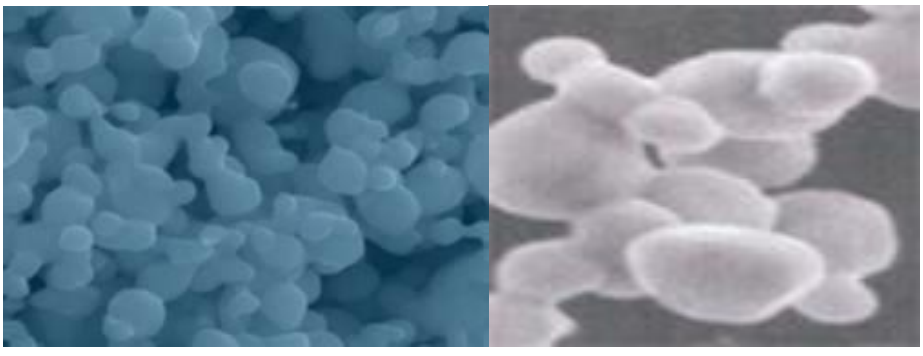
۱- فن‌آوری نانو تر (مرطوب): وظیفه این حوضه مطالعه سیستم‌های زیستی و زنده که در ابتدا در محیط آبی پرورش یافته‌اند، مانند مواد ژنتیکی، آنزیم‌ها و اجزای سلولی دیگر است.

۲- فن‌آوری نانو خشک: این شاخه به مطالعه سیستم‌های غیر زنده می‌پردازد که زمینه بررسی علوم فیزیک، شیمی و مواد است.

۳-فن‌آوری نانو محاسباتی: در ساخت مواد خودساز و خود ترمیم بی‌شک نرم‌افزارهایی نیاز خواهد بود که طرح آنها بر عهده این شاخه است. علاوه برآن زمینه‌هایی مانند شبیه‌سازی و مدل‌سازی مواد با ساختار نانو نیز مرتبط با این بحث خواهد بود (٦).

نانو ذره‌ها Nano Particle

به ذرات در قطعه نانو و کوانتومی که مطالعه آنها با ابزار و اصول مکانیک کوانتومی انجام می‌گیرد نانو ذرات، نانو پودرها و یا ذرات کوانتومی می‌گویند.



نانوذرات نقره

ویژگی‌ها و خواص نانو ذرات که آنها را به‌عنوان عوامل انقلاب صنعتی در هزاره سوم میلادی قرار داده است ناظر بر دو موضوع اساسی می‌باشد:

الف: اثر اندازه کوانتومی: به این معنا کـه وقتـی انـدازه ذرات مـواد اعـم از فلـزات، سـرامیک‌ها و ... کوچکتر از یک حد باشد (به عبارتی در محدوده نانو) آنگاه خواصی که این مواد نشان می‌دهند، الزامـا با خواص آنها در حالت محدود و کپه‌ای و حجیم Bulk یکسان نیست. بلکه ذرات نانومتری خـواص بسیار جالب و مطلوب و مفیدتری برای کاربردهای متفاوت نشان می‌دهند که خود یکی از عوامل رشد سریع تحقیقات روی نانو ذرات و پیش بینی استفاده بسیاری از آنها در صنایع مختلف می‌باشد.

ب- خواص تابع اندازه: به این معنا که نه تنها در حـوزه نـانومتری خـواص مـواد در حالـت حجـیم متفاوت می‌گردد، بلکه در همان محدوده نانومتری خواص جسم (ماده) تابع انـدازه آن می‌باشـد، مـثلاً بین دو ذره‌ی نانومتری در ابعاد ۱ و ۲ نانومتر شاهد تغییر خواص خواهیم بود و این یکی از مهمتـرین ویژگی‌های ذرات نانومتری (نانوذرات) است (٦).

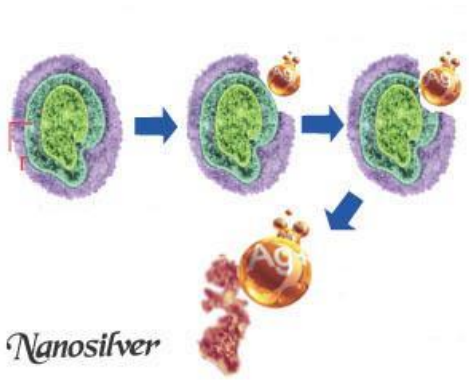
با توجه به گستردگی نانو ذرات و نیز گستردگی مواد کاربرد آنها از روش‌های مختلفی برای تولیـد این ذرات استفاده می‌شود که انتخاب آن بستگی به نوع ماده و کاربرد آن دارد. در تولیـد نـانو ذرات از دو روش اصلی و اساسی می‌توان استفاده کرد.

۱- روش‌های فیزیکی: که اصطلاحاً می‌توان آنرا روش بزرگ به کوچک هم نامید، قطعات بزرگ مواد مثل یک شمش طلا یا مس با استفاده از ابزار و ادوات فیزیکی به ذرات بسیار ریـز در مقیـاس نـانومتر تبدیل می‌شوند.

۲-روش‌های شیمیایی: که مبتنی بر هسته‌سازی و رشد می‌باشد و اصطلاحاً آنـرا روش از کوچـک بـه بزرگ هم می‌نامند با استفاده از واکنش‌های شیمیایی تولید ذرات امکان‌پذیر می‌گردد که در مقایسـه بـا روش فیزیکی بسیار ارزانتر و سهل‌الوصول‌تر می‌باشد. مزیـت ایـن روش‌هـا ارزان بـودن، در دسـترس بودن و ساده بودن آزمایشات و تولید نانو ذرات است.

هر کدام از این روشها به خودی خود، دارای راه‌کارهای جزئی‌تر می‌باشـد و همچنـین روش‌هـایی بین این دو مطرح است که به روش‌های مکانیکی- شیمیایی موسوم‌اند (۵).

یکی از این نانو ذرات، نانوذرات نقره یا Nano Silver می‌باشد. نقره در ابعـاد بزرگتـر فلـزی بـا خاصیت واکنش دهی کم می‌باشد، ولی زمانی که بـه ابعـاد کـوچکتر در حـد نـانومتر تبـدیل می‌شـود خاصیت میکروب‌کشی آن بیش از ۹۹درصد افزایش می‌یابد، نقره در ابعاد نانو بر متابولیسـم، تـنفس و تولید مثل میکروارگانیسم‌ها اثر می‌گذارد (٦).



در فن‌آوری نانوسیلوریون‌های نقره به دو صورت پودر (کامپوزیت) و مایع (کلوئید)تولید می‌شوند.

۱-کامپوزیت نانوسیلور: یا نانوسیلور گروه P، شامل ذرات نانو نقره پوشـش‌دهی شـده روی TiO_2 می‌باشد که در مجاورت رطوبت هوا به‌صورت کاملاً فتوکاتالیسـتی مـوادی همچـون OH^- و O_2^- کـه اکسیدکننده و احیا کننده‌های قوی هستند را تولید کرده که این امر باعث مهـار تولیـد ATP (مکـانیزم تولید انرژی) در انـواع میکروارگانیسـم‌ها می‌شـوند و شـامل P101 (۱ درصـد وزنـی نقـره)، P105 (۵درصد وزنی نقره)، P110 (۱۰درصد وزنی نقره) می‌باشند.

۲-کلوئید نانوسیلور: یا نانوسیلورگروه L، حاوی ذرات نانو نقره محلول شده در آب مقطـر می‌باشـد کـــه بـــا دوزهـــای 100L (100ppm ذرات نقـــره) 200L (200ppm ذرات نقـــره) و 2000L (2000ppm ذرات نقره) می‌باشد که خاصیت آنتی باکتریال را داراسـت و توانـایی تولیـد O_2^- را دارا هستند.این محلول‌ها از یون‌هـای نقـره در انـدازه‌های ۱۰۰-۱۰ نـانومتر (10^{-9}) تشـکیل شـده‌اند و در مقایسه با محلول‌های دیگر پایداری بیشتری دارند (۵). دو مکانیسم عمده نانو نقره‌ها عبارتند از:

۱- مکانیسم کاتابولیستی: تولید اکسیژن فعال توسط نقره، این مکانیسم بیشتر در مورد کامپوزیت‌های نانو نقره‌ای صدق می‌کند که روی پایه‌های نیمه هادی مانند TiO_2 یا SiO_2 قرار گرفته می‌شود. در این وضعیت ذره مانند یک پیل الکتروشیمیایی عمل می‌کند و با اکسید کردن اتم اکسیژن، یون اکسیژن و با هیدرولیز کردن آب، یون OH^- را تولید می‌کنند که هردو از بنیان‌های فعال و از قوی‌ترین عاملین ضد میکروبی نیز می‌باشند.

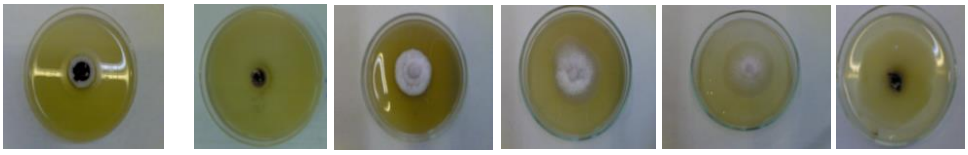
۲- مکانیسم یونی: دگرگون ساختن میکروارگانیسم به وسیله تبدیل باندهای SH^- به Sag^- در این مکانیسم ذرات نانونقره فلزی به مرور زمان یون‌های نقره از خود ساطع می‌کنند. این یون‌ها طی واکنش جانشینی، باندهای SH^- را در جداره میکروارگانیسم به باندهای Sag^- تبدیل می‌کنند، که نتیجه‌ای واکنش تلف شدن میکروارگانیسم است (۵). جنس فوزاریوم از رده قارچ‌های ناقص می‌باشدکه دارای گونه‌های متعددی بوده و بسیاری از گونه‌های آن بیماری‌زا است. در اغلب گیاهان از جمله گیاهان زراعی، باغی، علوفه‌ای، زینتی و جنگلی بیماری تولید می‌نماید و همه ساله در سراسر دنیا خسارات عمده‌ای وارد می‌سازد. بیماری پوسیدگی طوقه و بلایت خوشه گندم، پوسیدگی طوقه برنج و ساقه ذرت، انسداد آوندی و پژمردگی در گیاهان مختلف، پوسیدگی‌های انباری و پوسیدگی‌های میوه بعد از برداشت در محصولات مختلف نمونه‌هایی از بیماری‌های تولید شده بوسیله گونه‌های مختلف این قارچ است (۱). قدرت تولید و ترشح مایکوتوکسین‌های مختلف به وسیله تعدادی از گونه‌های فوزاریوم و زیان‌آور بودن آن برای سلامت انسان و دام از موضوعات مهمی است که در سال‌های اخیر مورد توجه محققین قرار گرفته است (۲). جنس فوزاریوم گسترش جهانی دارد و قدرت سازگاری در اقلیم‌های مختلف را دارا می‌باشد (۷). گونه *Fusarium moniliforme* دارای میزبان‌های متعددی است که از مهمترین آنها که موجب خسارات جبران‌ناپذیری می‌گردد، پوسیدگی طوقه برنج، پوسیدگی ساقه و دانه ذرت، پوسیدگی ساقه و ریشه در سورگوم و مارچوبه (۲). این گونه بذرزاد و خاکزاد می‌باشد و یکی از مهمترین توکسین‌هایی که تولید می‌کند مایکوتوکسین Fumonisin می‌باشد که در انسان و دام ایجاد بیماری می‌کند (۸).

مواد و روشها

به‌منظور بررسی تأثیر ماده نانوسیلور و تعیین غلظت موثر این ماده بر روی رشد قارچ، کلوئید نانوسیلور (حاوی ذرات نقره محلول شده) از شرکت نانو نصب پارس و قارچ *Fusarium*

moniliforme از آزمایشگاه گروه گیاه پزشکی دانشگاه علوم کشاورزی گرگان تهیه شد، دو آزمـایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و به‌صورت آزمایشگاهی به اجرا در آمده است که عبارتند از:

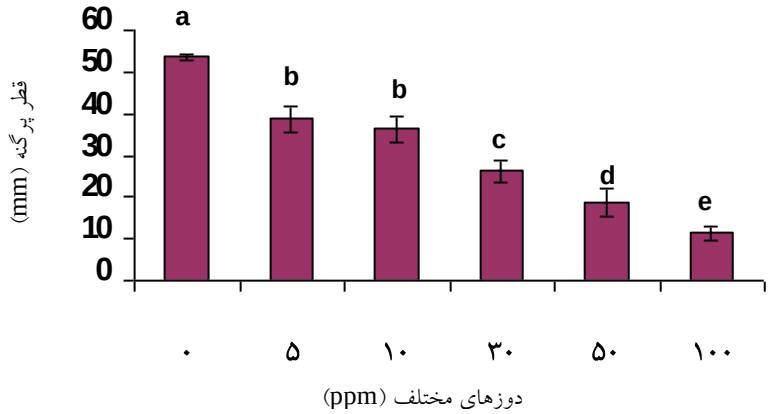
الف: مرحله اول: در آزمایش اول تاثیر دوزهای مختلف نانوسیلور که شامل: تیمارهای شاهد بدون نانوسیلور و سایر تیمارها عبارتند از: ۵ppm، ۱۰ ppm، ۳۰ppm، ۵۰ppm و ۱۰۰ppm نانوسیلور، در ۳ تکرار به‌منظور تعیین محدوده دوز موثر نانوسیلور انجام شد. به این ترتیب که پس از تهیه محیط کشت PDA و اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه به‌مدت ۱۵ دقیقه سترون شد و زمانی که دمای محیط به حدود ٤٥ درجه رسید به میزان ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت در بشر ریخته و داخل آن دوز مشخص شده نانوسیلور اضافه شده و به آرامی تکان داده تا کلوئید نانوسیلور به خوبی با محیط کشت مخلوط شود، سپس به مقدار مساوی در ۳ پتری به قطر ۹ سانتی‌متر ریخته و تا هنگام استفاده اجازه داده شد تا محیط آگار سرد شود، این عمل برای تمام دوزها تکرارگردید. از کشت ۲ روزه قارچ*F.moniliforme* یک حلقه ۵ mm در مرکز پتری‌ها قرار داده و پتری‌ها را در انکوباتور با دمای ۲±۲۳ درجه سانتی‌گراد قرارگرفت. بعداز ٤ روز قطر برگنه قارچ را با خط‌کش اندازه‌گیری کرده و میزان رشد قارچ را در دوزهای مختلف نانوسیلوربا نرم‌افزار SAS و آزمون LSD برای مقایسه میانگین در سطح ۵ درصد تجزیه و تحلیل گردید.



شاهد – ۵ppm – ۱۰ ppm – ۳۰ ppm – ۵۰ ppm – ۱۰۰ppm

شکل ۱- تاثیر مقادیر دوز نانوسیلوربر کاهش میانگین رشد قارچ *F.moniliforme* در مقایسه با شاهد پس از ٤ روز.

ب- مرحله دوم: پس از اینکه رشد قارچ مشخص شد در محدوده کـدام دوز تفـاوت معنـی‌داری بـا سایر تیمارها داشته است، این محدوده را به قسمت‌های کوچکتر تقسیم کرده، به این صورت که تیمـار اول یا شاهد بدون نانوسیلور، سایر تیمارها بترتیـب شـامل: ۲۰ppm، ۲۵ppm، ۳۵ppm، ٤٠ppm و تیمار ٦٠ppm، نانوسیلور بودند.



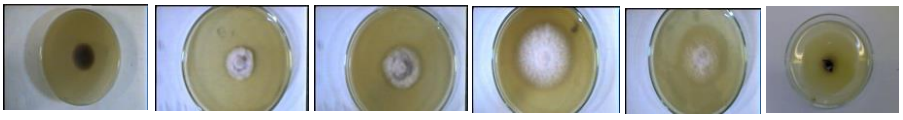
شکل ۲- مقایسه میانگین تاثیر دوزهای مختلف نانوسیلور بر روی رشد قارچ *F.moniliforme* پس از ٤ روز.

جدول ۱- تجزیه واریانس تاثیر دوزهای مختلف نانوسیلور بر روی رشد قارچ *F.moniliforme* پس از ٤ روز

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F
تکرار	۲	٤/۸٦۱	۲/٤۳۰	۰/۲٤
تیمار	۵	۳٤٤٦/۹۰۲	٦۸۹/۳۸۰	٦۸/۳۹

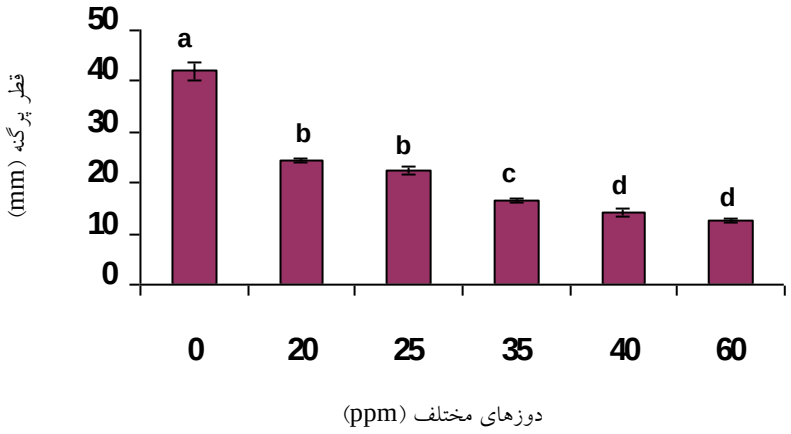
نتایج و بحث

نتایج نشان داد که از دوز ۳۰ppm به بعد داده‌ها در تیمارهای مختلف دارای تفاوت معنـی‌داری در سطح p=۰/۵ هستند (شکل ۲). برای اطمینان بیشتر از دوزهای کـاهش یافتـه مجـدداً آزمـایش را بـا ۲۰ppm شروع نموده تا اینکه موثرترین دوز را بدست آوریم.



شاهد – ۲۰ ppm– ۲۵ ppm – ۳۵ppm – ٤۰ ppm – ٦۰ ppm-

شکل ۳- تاثیر مقادیر دوزهای تفکیک شده نانوسیلور بر کاهش میانگین رشد قارچ *F.moniliforme* در مقایسه با شاهد پس از ٤ روز.



شکل ٤- مقایسه میانگین تاثیر دوزهای تفکیک شده نانوسیلور بر روی رشد قارچ*F.moniliforme* پس از ٤ روز.

جدول ۲- تجزیه واریانس تاثیر دوزهای تفکیک شده نانوسیلور بر روی رشد قارچ *F.moniliforme* پس از ٤ روز.

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F
تکرار	۲	۳/۱۱۱	۱/۵۵۵	۱/۷۵
تیمار	۵	۱۷٤۰/۷۳٦	۳٤۸/۱٤۷	۳۹۱/٦۷

در آزمایش دوم نتایج نشان داد که دوزهای کاهش یافته نسبت به آزمایش اول بطور موثرتری روی رشد پرگنه قارچ تأثیرگذار هستند (شکل ٤). بطوری که دوزهای کاهش یافته در آزمایش دوم از تیمار ۲۵ppm به بعد حدود ۵۰ درصد یا حتی بیشتر کاهش رشد قطر ریسه‌های فوزاریوم را پس از چهار روز نشان داد. در حالی که برخی از گونه‌های فوزاریوم به قارچکش‌های رایج مثل تیابندازول مورد استفاده در کشاورزی مقاومت نسبی نیز نشان می‌دهند (۷ و ۸). در این آزمایش نشان داده شد که نانوسیلور در مدت زمان کوتاه کاهش چشمگیری در رشد ریسه‌های این قارچ دارد. در بعضی موارد در غلظت‌های بالا دیده شده که قارچ با تولید پیگمان‌های رنگی بقاء خود را در سطح کاهش یافته حفظ کرده است که این موضوع به خاصیت بازدارندگی این ماده ارتباط دارد. بنابراین می‌توان گفت که نانوسیلورها علاوه بر خاصیت آنتی باکتریال، به نسبت بالایی خاصیت ضد قارچی را هم دارند و چون

این ذرات کلوئیدی اثرات مخربی بر روی محیط زیست ندارند (۳ و ٤) می‌توان برای مبارزه با قارچ‌های عامل بیماریزای فوزاریوم از آنها در آینده در صورت آزمایش‌های تکمیلی استفاده کرد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از همکاری شرکت نانو پارس ایران و آقای محمدرضا محبوب در نمایندگی استان گلستان به جهت در اختیار گذاشتن ماده نانو سیلور برای انجام این تحقیق، صمیمانه تشکر می‌شود، همچنین از مدیرعامل شرکت آقای مهندس جعفر رحمانیا به جهت توصیه‌های علمی و حمایت شایسته نیز قدردانی می‌شود.

منابع

۱.صارمی، ح. ۱۳۷۹. بیماری‌های گیاهی ناشی از گونه‌های فوزاریوم. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد.۱٦۰ص.

۲.صارمی، ح. ۱۳۷۷. اکولوژی و تاکسونومی گونه‌های فوزاریوم. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد.۱۳۲ص.

۳.قاضی‌نوری، س.س. ۱۳۸۱. سیاست‌گذاری و برنامه‌ریزی علم و فناوری، مطالعه موردی نانو تکنولوژی در ایران. کمیته مطالعات سیاسیت نانو تکنولوژی دفتر همکاری‌های فناوری ریاست جمهوری با همکاری نشر آتنا. ۱٦۰ص.

٤.نانوتکنولوژی آئینه تکنولوژی آفرینش. ۱۳۸۰. برنامه پیشگامی ملی نانوتکنولوژی آمریکا. کمیته مطالعات سیاسیت نانو تکنولوژی با همکاری نشر آتنا. ۲۳۰ص

۵.گروه علمی دانشجویی نانو فناوری دانشگاه کاشان. ۱۳۸٤. درآمدی بر نانو فناوری خشک. نشر آراسته.

٦.کمیته مطالعات سیاست نانوتکنولوژی و انجمن علمی دانشجویی نانوتکنولوژی دانشکده فنی تهران با همکاری نشر آتنا. ۱۳۸۰. نانوتکنولوژی آئینه تکنولوژی آفرینش.۱۱۲ص

7.Kawchuk, L.M., Hutchison, K.J., Verhaeghe, C.A., Lynch, D.R., Bains, P.S. and Holey, J.D. 2002. Isolation of the β tubulin gene and characterization of thiabendazole resistance in *Giberella Pulcouris*. Canadian Journal of Plant Pathology. 24(2). 233-238.

8.Nelson, P.E. 1981. Life Cycle and epidemiology of *Fusarium oxysporum*. Fungal wilt Disease of Plant. Academic press, NewYork. P 51-80.

9.Rosales, M.A. Mew, W.T. 1997. Suppression of *Fusarium moniliforme* in Rice by Rice-Associated Antagonistic Bacteria. Plant Disease. Vol. 81:1-49-52.