

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

سیما کاظمیان<sup>۱</sup>، وحید زرین‌نیا<sup>۲\*</sup>، محمود خسروشاهلی<sup>۳</sup> و نادر حسن‌زاده<sup>۴</sup>

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 پذیرش: آبان ۱۳۹۷

تاریخ اصلاح نهایی: آبان ۱۳۹۷

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۶

### 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٪ ( $P \leq 1\%$ ) 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 به ترتیب 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.

## 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 ویتامین‌ها از جمله 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 گوجه‌فرنگی ممکن است در معرض عوامل بیماری‌زای زنده (قارچ‌ها، باکتری‌ها، ویروس‌ها، نامات‌ها، فیتوپلازماها و گیاهان انگل‌گذار) یا غیر زنده قرار گرفته و با توجه به شرایط محیطی مختلف و نوع رقم، دچار کاهش محصول یا کاهش بازاریسندی میوه شوند. از مهمترین بیماری‌های قارچی گوجه‌فرنگی می‌توان به بیماری کپک خاکستری با عامل *Botrytis cinerea* اشاره نمود. شبه جنس *Botrytis cinerea*, *Botryotinia fukelinia* (tel) 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.* از جمله *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 می‌کند. بیماری کپک خاکستری می‌تواند 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 می‌شود و باعث ایجاد شانکر روی ساقه می‌گردد که این شانکرها می‌توانند 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 می‌شوند، سپس لکه‌ها 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 گوجه‌فرنگی 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 می‌شود 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 شده‌است. 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 ضد میکروبی جدید به‌وجود آمده‌اند، زیرا نسبت سطح به حجم بالا و خواص فیزیکی و شیمیایی منحصر به فردشان، تماس آنها را با میکروب‌ها افزایش می‌دهد (Kim et al., 2007). اخیراً فعالیت‌های ضد میکروبی نانومواد 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 رسیده‌است. اثرهای

بر روی باکتری گرم منفی *Escherichia coli* و باکتری گرم مثبت *Staphylococcus aureus* مورد بررسی قرار گرفت (Ingle et al., 2008; Feng et al., 2000) و مشاهده شد که نانوذرات نقره با اندازه میانگین ۱۶ نانومتر و در غلظت پایین ۶۰ میلی گرم در میلی لیتر برای باکتری *E. coli* کاملاً مضر می باشد (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 محیط زیست همانند تأثیر مخرب بقایای سموم و ریسک پذیری بالای استفاده از این ترکیب ها برای کنترل بیماری های 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 گوجه فرنگی مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش ها

### تهیه قارچ عامل بیماری

جدایه های قارچ *B. cinerea* از کلکسیون قارچ شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران تهیه شد. این جدایه قبلاً با روش های مورفولوژیکی و مولکولی مورد شناسایی قرار گرفته بود. آزمون اثبات بیماری زایی این جدایه برای بررسی توان بیماری زایی آنها روی بوته های گوجه فرنگی رقم سوپر استرین B در مرحله هشت هفته ای و میوه گوجه فرنگی با سوسپانسیون اسپوری  $1 \times 10^5$  اسپور بر میلی لیتر انجام و در نهایت اصول کُخ مورد بررسی قرار گرفت.

### تهیه عصاره گیاهی

برای عصاره گیری از برگ های تازه گیاه اکالیپتوس (*Eucalyptus sp.*) استفاده گردید. برگ ها با استفاده از آب

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 برگ های گیاه *Lepisanthe tetraphylla* نانوذراتی با حدود اندازه ۹۰-۲۰ نانومتر تولید کرده اند و بعد اثر نانوذرات تولید شده را بر عوامل بیماری زای انسانی بررسی کردند. با بررسی گونه های *Escherichia coli* *Staphylococcus aureus* *Acinetobacter* و *Pseudomonas aeruginosa* دریافتند که نانوذرات تولیدی می توانند 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. به عنوان مثال، فعالیت ضدباکتری نانوذرات اکسید مس با اندازه ۶۰ تا ۱۸۰ نانومتر بر روی رایزوباکتری های *Pseudomonas aeruginosa* *Klebsiella pneumonia* *Salmonella paratyphi* مشاهده شد (Mahapatra & Khan, 2007). همچنین نانوذرات مس، قادر به مهار میکروارگانیسم های دیگری مانند *Saccharomyces cerevisie* *Staphylococcus aureus* *E. coli* *Listeria* spp. شدند (Cioffi et al., 2005). سازوکار عمل نانوذرات حاوی مس واکنش با پروکسیدهای موجود در طبیعت و تولید رادیکال های آزاد است که برای میکروارگانیسم ها بسیار سمی هستند (Ingle et al., 2008). بررسی اثر مس و نانو مس بر جوانه زنی بذر فلفل نشان داد که سولفات مس در دو غلظت رشد و جوانه زنی را کاهش داده و با افزایش غلظت روند کاهش روبه افزایش گذاشته است. از سوی دیگر، نانو مس در غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر روی بیشتر ویژگی های رشد تأثیر مثبت داشته و منجر به افزایش درصد جوانه زنی، سرعت جوانه زنی و طول گیاهچه های فلفل شده است (Afifipur & Haghghi, 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

(SEM: Scanning Electron Microscopy) به وسیله سیستم KYKY (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 بندد. 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 غلظت‌های مختلف نانو ذرات مس سنتز شده با بهره‌گیری از فرمول ابوت (Abbott, 1925) تعیین شد.

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 ( $\text{CuSO}_4$ ) تهیه و روی هیتر قرار داده شد. در مرحله بعد عصاره اکالیپتوس به نسبت (۱:۱۰) به محلول سولفات مس به صورت قطره قطره اضافه و اجازه داده شد تا دما به ۷۰-۸۰ 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-K $\alpha$  ( $\lambda=0.15406 \text{ nm}$ ) در گستره 2 $\theta$  از ۲۰ تا ۸۰ درجه استفاده شد. برای مشاهده خصوصیات ریخت‌شناسی نانوذرات تولید شده و اندازه آنها از میکروسکوپ الکترونیکی روبشی

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

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

(Minimum Inhibitory Concentration) MIC، حداقل غلظت مهارکننده از رشد قارچ یا حداقل غلظت بازدارندگی و (Minimum Fungicide Concentration) MFC، حداقل غلظت قارچ‌کشی تعیین شد.

بریده سترون شده محلول‌پاشی شد و ۶ ساعت بعد سوسپانسیون اسپور با غلظت  $4 \times 10^6$  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 ۱-۲ 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 تجزیه و تحلیل 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٪ ( $P \leq 1\%$ ) انجام شد. نرمال بودن تمام داده‌ها قبل از انجام بررسی‌های آماری توسط نرم‌افزار Minitab 14 مورد بررسی قرار گرفت.

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 سوسپانسیون 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  $4 \times 10^6$  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

## نتایج

ارزیابی نانوذرات اکسید مس سنتز شده

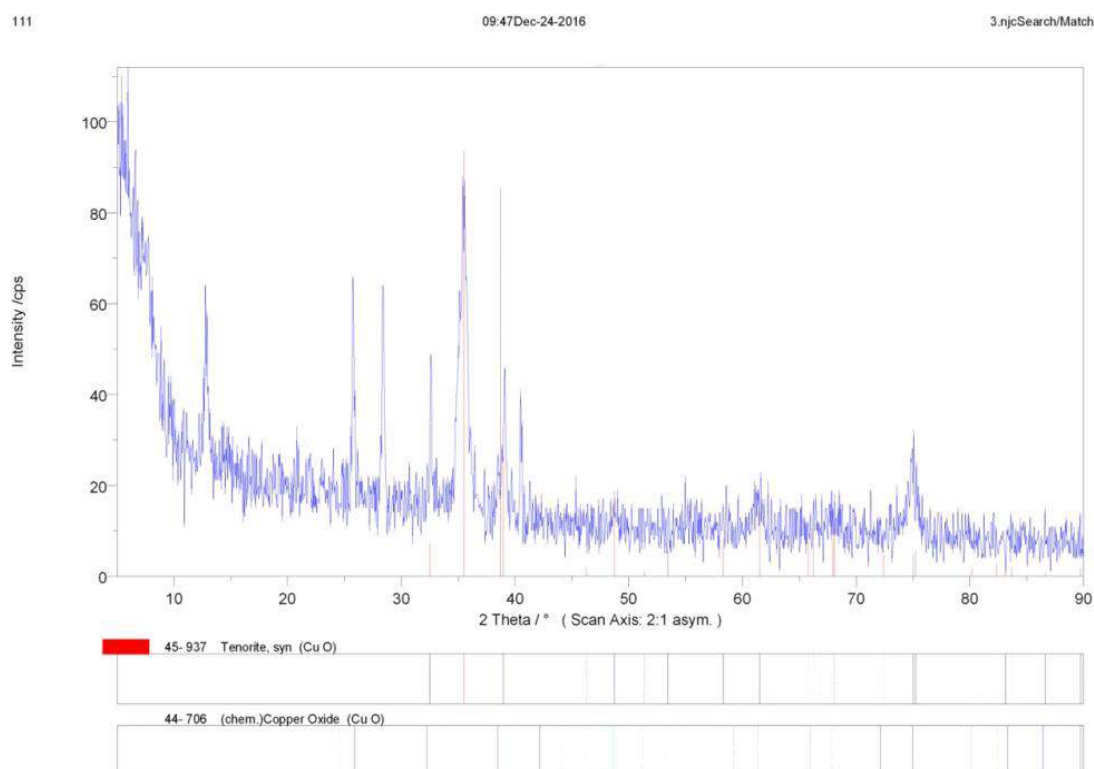
الف) نتیجه بررسی نانوذرات سنتز شده به وسیله روش

پراش پرتو X- (X-ray diffraction: XRD)

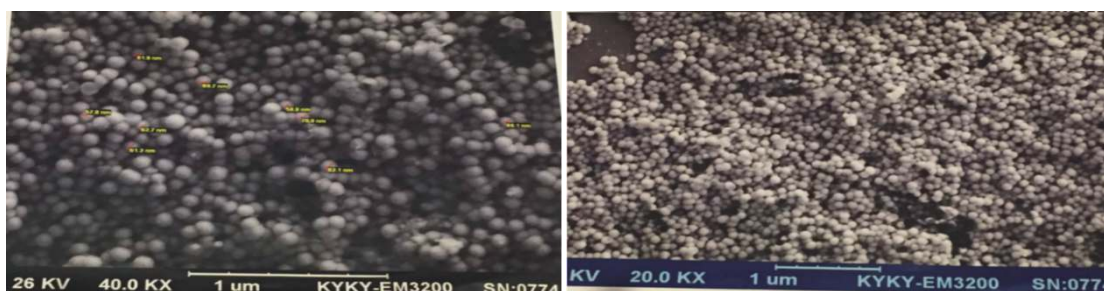
به منظور بررسی خلوص نانوذرات تولید شده طیف پراش پرتو X- (XRD) مورد بررسی قرار گرفت. پرتو طیف XRD تشکیل نانوذرات اکسید مس تک مرحله را مورد تأیید قرار داد (شکل ۱).

ب) نتیجه میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

نتایج میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، نتایج حاصل از طیف سنجی 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) نانوذرات اکسید مس (CuO)

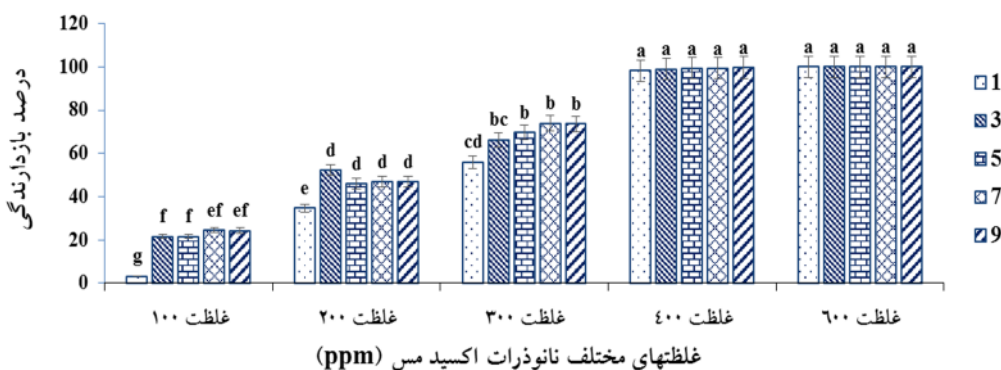


شکل ۲- تصویر میکروسکوپ اسکن الکترونی از نانوذرات اکسید مس بیوسنتز شده توسط گیاه اکالیپتوس

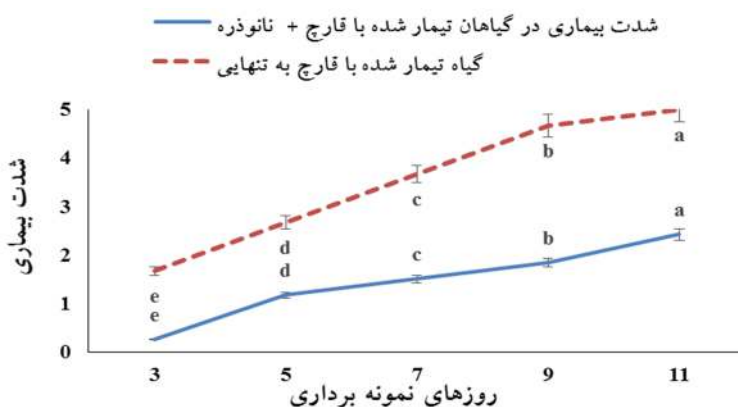
که این اثرها وابسته به مقدار می باشند. بر این اساس کمترین درصد بازدارندگی مربوط به غلظت ۱۰۰ قسمت در میلیون نانو ذرات برابر ۱۹٪ و غلظت ۶۰۰ و ۴۰۰ قسمت در میلیون نیز ۱۰۰٪ بازدارندگی از رشد را نشان داده و از نظر آماری با یکدیگر اختلاف معنی داری در سطح احتمال ۱٪ نداشتند (شکل ۳). همچنین غلظت ۴۰۰ قسمت در میلیون نانو ذرات اکسید مس به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی و غلظت ۶۰۰ قسمت در میلیون نانو ذرات اکسید مس به عنوان حداقل غلظت قارچ کشی تعیین گردید.

بررسی اثر ضد قارچی نانو ذرات بیوستنز 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 نانو ذرات روند درصد بازدارندگی رو به افزایش گذاشت. از این رو، تمامی داده ها 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، به عبارت دیگر می توان گفت

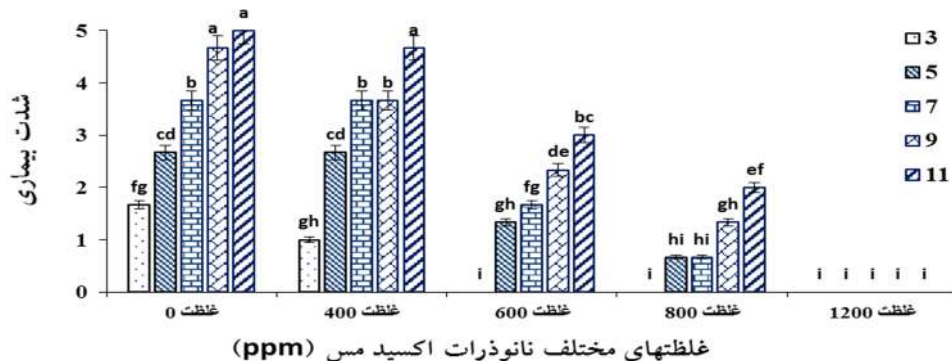


شکل ۳- مقایسه میانگین درصد بازدارندگی غلظت های مختلف نانو ذرات اکسید مس بر ممانعت از رشد میسلیومی قارچ *B. cinerea* در شرایط آزمایشگاهی (in vitro)



شکل ۴- مقایسه میانگین شدت بیماری در گیاهان تیمار شده با قارچ *B. cinerea* در مقایسه با گیاهان تیمار شده با غلظت های مختلف نانو ذرات اکسید مس

به علاوه 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 هیچ گونه علائمی از بیماری روی گیاه تیمار شده با این غلظت مشاهده نشد و نتیجه آزمایش در این قسمت اختلاف معنی داری را در سطح احتمال ۱٪ ( $P \leq 1\%$ ) با گیاه سالم نداشت. همچنین غلظت ۴۰۰ قسمت نانوذره در میلیون بیشترین میانگین شدت بیماری را از خود نشان داد. این امر نشان دهنده وجود یک رابطه معکوس و معنی دار بین میزان غلظت نانوذره و توان کنترل شدت بیماری بود، به گونه ای که شدت بیماری در گیاهان تیمار شده با غلظت های پایین تر از نظر آماری با شاهد منفی فاقد اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۱٪ ( $P \leq 1\%$ ) بودند. این امر نشان دهنده عدم موفقیت این غلظت ها در مهار مناسب بیماری می باشد. 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 نمونه برداری

احتمال ۱٪ ( $P \leq 1\%$ ) وجود داشت. با این حال بین اثر متقابل آنها از نظر آماری تفاوت معنی داری مشاهده نشد. در تمامی تیمارها، با افزایش تعداد روزهای بعد از تلقیح میانگین شدت بیماری به مرور افزایش یافت. اگرچه در تمامی روزهای نمونه برداری میانگین شدت بیماری در

بررسی اثر ضد قارچی نانوذرات 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 نمونه برداری و اثر متقابل آنها تفاوت معنی داری در سطح احتمال ۱٪ ( $P \leq 1\%$ ) 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٪ ( $P \leq 1\%$ ) اختلاف معنی داری را از خود نشان دادند. به گونه‌ای که از شدت بیماری در گیاهان تیمار شده کاسته شده بود. این امر نشان دهنده توان مؤثر نانوذرات اکسید مس در مهار بیماری کپک خاکستری ناشی از قارچ *B. cinerea* می باشد (شکل ۴).

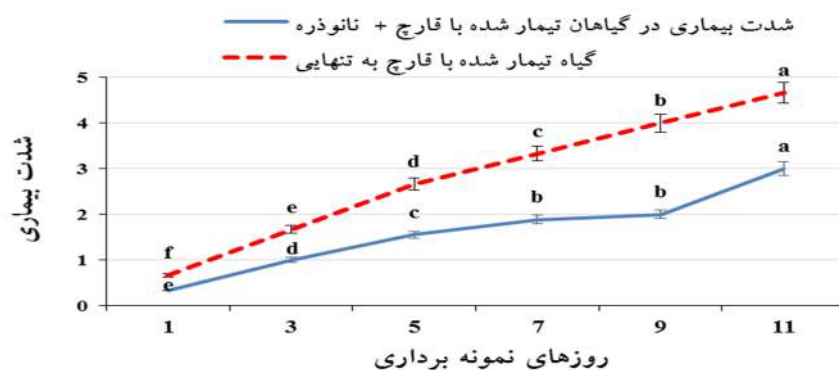
ارزیابی تأثیر نانوذرات اکسید مس بر مهار بیماری کپک خاکستری روی برگ بریده

بین غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید مس و زمان‌های متفاوت نمونه برداری تفاوت معنی داری در سطح



داشته‌اند؛ به گونه‌ای که میزان شدت بیماری در گیاهان تیمار شده با نانوذرات نسبت به شاهد مثبت دارای میانگین شدت بیماری کمتری بودند (شکل ۶).

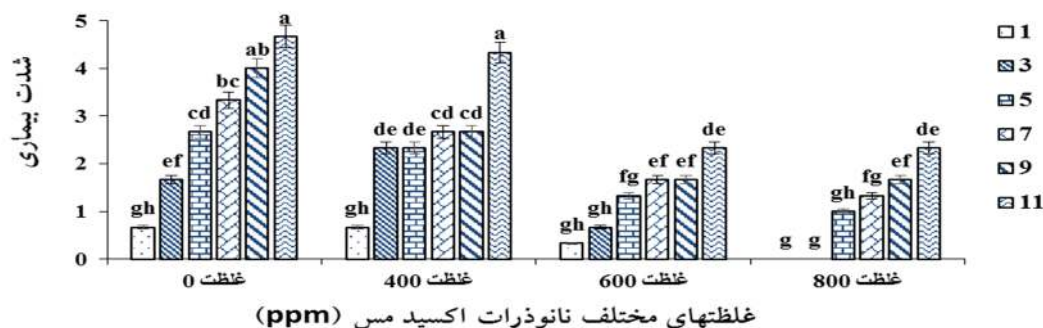
گیاهان تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانوذرات نسبت به شاهد مثبت (برگ‌های آلوده شده با قارچ *B. cinerea*) بود، اما اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ ( $P \leq 1\%$ )



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

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؛ به نحوی 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 بدست آمده در این آزمون با نتایج مربوط به آزمون شرایط آزمایشگاهی (*in vitro*) و گلخانه‌ای (*in vivo*) همسو بود (شکل ۷).

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 غلظت‌های 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٪ ( $P \leq 1\%$ ) در آنها مشاهده نشد. این امر نشان‌دهنده عدم موفقیت غلظت‌های پایین در مهار مناسب بیماری می‌باشد. حال آنکه در غلظت‌های بالاتر بیماری به خوبی مهار شده، به گونه‌ای که در غلظت ۸۰۰ قسمت در میلیون کمترین شدت بیماری



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

## بحث

اطلاعات اندکی در مورد فعالیت ضد میکروبی نانوذرات اکسید مس (CuO) در دسترس است. نانوذرات اکسید مس (CuO) از بسیاری از ترکیب های با فعالیت ضد میکروبی از قبیل طلا و نقره ارزان تر است و به آسانی با پلیمرها مخلوط می گردد 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 به عنوان عوامل ضد میکروبی می باشند و می توانند با ناحیه سطحی بسیار وسیع و مورفولوژی های کریستالی مختلفی تهیه شوند (Stoimenov, 2002).

نتایج بدست آمده از تأثیر غلظت های مختلف نانوذرات اکسید مس بر رشد پرگنه قارچ در محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار (PDA)، در زمان های مختلف در این تحقیق نشان داد که بین تیمارها و زمان های مختلف تفاوت معنی داری در سطح احتمال ۱٪ ( $P \leq 1\%$ ) وجود داشت. اثر کاربرد نانوذرات با بالا رفتن غلظت آنها افزایش یافته است و در غلظت های بالاتر این نانو ذرات خاصیت قارچ کشی داشتند. تأثیر نانوذرات اکسیدی در غلظت های بالا در نتایج Wani و Shah (۲۰۱۲) که اثر نانوذرات اکسید روی و اکسید منیزیم را بر روی قارچ های *Rhizopus stolonifer* *Fusarium oxysporum* 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 نانویلاتین (نانوذرات فلزی) باعث تخریب باکتری ها و قارچ ها می شوند. این محققان با استفاده از میکروسکوپ الکترونی تغییرات مورفولوژی حاصل از برهم کنش میکروارگانیسم ها و نانوذرات را مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که این برهم کنش باعث آسیب دیدن سلولهای قارچ می شود. نانوذرات به سطح سلول میکروارگانیسم متصل می شوند و این اتصال باعث

تغییرات ساختمانی و آسیب سلول می گردد و به طور خاص فعالیت های حیاتی سلول مانند نفوذپذیری و فعالیت آنزیم های زنجیره تنفسی را مختل نموده و در نهایت منجر به مرگ سلول می شوند. نانوذرات اکسید مس با آزادسازی یون  $Cu^{2+}$  آسیب جدی به DNA وارد می کند. همچنین این نانوذرات می توانند با اندام هایی مانند میتوکندری برهم کنش داشته باشند و فعالیت پروتئین های تحریک کننده رادیکال های اکسیژن آزاد را در سلول ها کاهش دهند (Bondarenko et al., 2012).

نانوذرات استفاده شده در این بررسی به صورت بیولوژیک و توسط گیاه اکالیپتوس بیوسنتز شده بود که در گزارش های 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. بیشترین فعالیت ضد قارچی را علیه *Aspergillus* sp. و *Fusarium* sp. و *Rhizopus* sp. داشته است. همچنین نانو ذرات نقره تولیدی توسط گیاه *Svensonia hyderabadensis* بالاترین فعالیت ضدباکتریایی را علیه *E. coli* sp. و *Bacillus* sp. و بالاترین فعالیت ضد قارچی را علیه *Fusarium* sp. *Rhizopus* sp. و *Aspergillus* sp. از خود نشان داده است (Savithramma et al., 2011).

اگرچه بررسی های آزمایشگاهی روش خوبی برای ارزیابی مقدماتی تأثیر نانوذرات در مهار قارچ می باشد، اما براساس نتایج آزمایشگاهی به تنهایی نمی توان به مفید بودن اثر این نانوذرات و میزان واقعی اثر آنها بر روی قارچ مورد نظری 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 می شوند. اما در شرایط گلخانه، عوامل زیادی مانند دما و تغییرات آن، اسیدیته، رطوبت، بافت خاک و رفتار سایر میکروارگانیسم ها مؤثر می باشند. از سویی هم با توجه به اینکه از سرنوشت این

نقره تولید شده توسط برخی قارچ‌ها از پایداری زیادی برخوردار می‌باشند. شاید دلیل آن تثبیت نانو ذرات نقره توسط برخی پروتئین‌ها باشد.

در سال‌های 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 ضد میکروبی 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 نانو ذرات، پلی بین حالت حجیم ماده و حالت اتمی یا مولکولی هستند، مورد توجه قرار گرفته‌اند. نانو ذرات فلزی به دلیل خصوصیات جالب توجه الکتریکی، اپتیکی، شیمیایی و مغناطیسی که از خود نشان داده‌اند، مورد بررسی‌های فراوان قرار گرفته‌اند. بنابراین نتایج بدست آمده از مجموع آزمایش‌های گلخانه‌ای و شرایط آزمایشگاهی نشان‌دهنده تأثیر مطلوب نانو ذرات اکسید مس در مهار قارچ *B. cinerea* می‌باشد. نتیجه‌گیری مهم دیگر حکایت از این دارد که تأثیرات یا سمیت نانو ذرات اکسید مس وابسته به دوز مصرفی و زمان مصرف آنها در گیاه می‌باشد. در نهایت با توجه به تأثیر مطلوب نانو ذرات 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.

نانو ذرات پس از وارد شدن به بافت گیاه اطلاعات کاملی در دسترس نیست، انجام آزمایش‌های گلخانه‌ای ضروری می‌باشد. در بررسی‌های گلخانه‌ای نیز همانند بررسی‌های آزمایشگاهی غلظت‌های بالاتر تأثیر مؤثرتری در مهار بیماری داشتند و به‌خوبی شرایط آزمایشگاهی قادر به مهار بیماری بودند. از آنجایی‌که در این تحقیق نانو ذرات 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 ترکیب‌ها در مهار بیماری دارد. به‌عبارتی دیگر، مشاهدات گلخانه‌ای نشان داد که کاربرد این نانو ذرات 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) نانو ذرات نقره را بر روی دو قارچ *Sphaerotheca fuscata* و *Golovinomyces cichoracearum* عامل سفیدک سطحی در خیار و کدو، در دو حالت قبل و بعد از ظهور بیماری بکار بردند. در پژوهش بالا کاربرد نانو ذرات 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 نانو ذرات 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 ضد میکروبی نانو ذرات بسیار تعیین کننده می‌باشد. البته هرچه اندازه ذرات کوچکتر باشد (۱۵ تا ۹۰ نانومتر) اثر ضد میکروبی نانو ذرات به دلیل افزایش سطح به حجم بیشتر شده و هرچه شکل منظم‌تر و غلظت بالاتر باشد درجه تأثیرگذاری آنها بالاتر می‌باشد. محققان بسیاری تأثیر نانو ذرات سنتز شده طبیعی یا بیولوژیک را با نانو ذرات شیمیایی مقایسه کرده‌اند و به این نتیجه رسیده‌اند که تأثیرگذاری نانو ذرات بیولوژیک در مهار بیماری‌های گیاهی بالاتر از نانو ذرات شیمیایی است. Joerger و همکاران (۲۰۰۰) گزارش کردند که نانو ذرات

- 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<sub>2</sub> 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, hydroxylanilide, benzimidazole, and dicarboximide fungicides. *Plant Disease*, 91: 407-413.
  - Panacek, A., Kolar, M., Vecerova, R., Pucek, 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.
  - Afifpur, Z. and Haghghi, 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., Orłowski, 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. Scientific Ltd, 2-11.
  - Hua, L., Yong, C., Zhanquan, Z., Boqiang, L., Guozheng, Q. and Shiping, T., 2018. Pathogenic mechanisms and control strategies of *Botrytis*

- 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* strains 101 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

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

S. Kazemian<sup>1</sup>, V. Zarrinnia<sup>2\*</sup>, M. Khosroshahli<sup>1</sup> and N. Hasanzadeh<sup>3</sup>

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 vivo* 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.