

ارزیابی تأثیر نانو ذرات نقره در کنترل بیماری پوسیدگی ریشه ناشی از قارچ *Fusarium solani* f. *sp. phaseoli* در گیاه لوبیا

وحید زرین نیا^{۱*} و حامد شیخی^۲

۱. دکتر وحید زرین نیا استادیار دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران
۲. حامد شیخی دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه علوم کشاورزی و صنایع غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران
(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۰۷ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۲۸)

چکیده

گیاه گلرنگ با نام علمی *Carthamus tinctorius L.* از خانواده کمپوزیته و با فعالیت آنتی اکسیدانی می باشد. فعالیت ضد قارچی نانوذرات نقره سنتز شده توسط عصاره گل های گلرنگ علیه بیماری پوسیدگی ریشه لوبیا ناشی از قارچ *Fusarium solani* در شرایط آزمایشگاهی، گلخانه ای و مزرعه ای بررسی شد. سنتز نانوذرات نقره با روش آنالیز طیف سنجی (UV-Vis) (تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR)، پراش اشعه ایکس (XRD) و میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) ارزیابی شد. فاکتور شدت بیماری در هر بوته لوبیا چیتی (*Phaseolus vulgaris L.*) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تشکیل نانوذرات نقره با تغییر رنگ محلول نیترات نقره به قهوه ای تیره بعد از اضافه کردن عصاره به محلول نیترات نقره تایید شد. وجود ماکزیمم جذب توسط آنالیز UV-Vis در محدوده ۴۱۵ نانومتر دلیلی بر سنتز نانوذرات می باشد. میکروسکوپ الکترونی عبوری شکل نانوذرات را کروی نشان داد. آنالیز XRD اندازه متوسط نانوذرات را ۲۰ نانومتر نشان داد. در شرایط آزمایشگاهی، با استفاده از تکنیک اختلاط با محیط کشت حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) روی نرخ رشد میسلومی قارچ غلظت ۲۰۰ پی پی ام شد. اثرات بازدارندگی نانوذرات در شرایط گلخانه ای غلظت ۸۰۰ پی پی ام و در شرایط مزرعه ای غلظت ۱۰۰۰ پی پی ام با روش آغشته سازی بذرهای لوبیا با نانو ذرات مطلوب ارزیابی شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر متقابل بین غلظت نانو ذرات مختلف و تاثیر قارچ عامل بیماری بر روی شاخص های اندازه گیری شده معنی دار است.

واژه‌های کلیدی: اثر بازدارندگی، سنتز زیستی، فعالیت ضد قارچی، گیاه گلرنگ، لوبیا چیتی، نانو ذرات نقره.

Effect of biosynthesized silver nanoparticles on *Fusarium solani* the cause of root rot bean's disease

Vahid Zarrinnia^{*1} and Hamed Sheikhi²

1. Vahid Zarrinnia Assistant Professor, Faculty of Agricultural Sciences and Food Industries, Islamic Azad University, Research Sciences Branch, Tehran
 2. Hamed Sheikhi, M.Sc. Student of Biotechnology and Breeding of Agriculture, Faculty of Agricultural Sciences and Food Industries, Islamic Azad University, Tehran Research Sciences Branch
- (Received: May, 28, 2022 - Accepted: Now, 19, 2022)

ABSTRACT

The Safflower *Carthamus tinctorius L.* belongs to the composite family and has antioxidant activity. Antifungal activity of silver nanoparticles synthesized by Safflower *Carthamus tinctorius L.* extract was investigated against bean root rot disease caused by *Fusarium solani* in laboratory, greenhouse and field conditions. The synthesis of silver nanoparticles was evaluated by spectroscopic analysis (UV-Vis), Fourier transform infrared (FTIR), X-ray diffraction (XRD) and transmission electron microscopy (TEM). Factor disease severity were investigated in each pinto bean (*Phaseolus vulgaris L.*) plant. The results of the formation of silver nanoparticles were confirmed by changing the color of the silver nitrate solution to dark brown after adding the extract to the silver nitrate solution. The existence of the absorption maximum by UV-Vis analysis in the range of 415 nm is a proof of the synthesis of nanoparticles. Transmission electron microscopy showed the shape of nanoparticles to be spherical. XRD analysis showed the average size of nanoparticles to be 20 nanometers. In laboratory conditions, using the technique of mixing with the culture medium, the minimum growth inhibitory concentration (MIC) on the mycelial growth rate of the fungus was 200 ppm. PPM was evaluated by impregnating bean seeds with nanoparticles. The results of analysis of variance showed that the interaction effect between the concentration of different nanoparticles and the effect of the disease-causing fungus on the measured indicators is significant.

Key words: Green synthesis, AgNPs, *Carthamus tinctorius*, antifungal activity.

* Corresponding author E-mail: zarrinnia@gmail.com

مقدمه

فن آوری نانو توانایی هایی فراوان در جهت استقرار کشاورزی پایدار دارد. نانو ذرات به دلیل تأثیر بسیار بالا در کنترل قارچ ها ، باکتری ها می توانند کاربردهای فراوانی در کشاورزی و صنایع وابسته به آن داشته باشند و بر علیه موجودات زنده مضر مانند باکتری ها، ویروس ها و قارچ ها به کار روند. استفاده از نانو ذرات نقره به منظور دفع علف های هرز، قارچ ها و تولید مواد پوشش دهنده ضد میکروبی، از جمله کاربردهای فناوری نانو در بخش کشاورزی است که به سرعت در حال گسترش می باشد. کاربرد نانو ذرات نقره به منظور کنترل آفات و بیماری های قارچی برنج گزارش شده است (Karamkash., 2006).

نانو ذرات به دلیل تأثیر بسیار بالا در کنترل قارچ ها ، باکتری ها می توانند کاربردهای فراوانی در کشاورزی و صنایع وابسته به آن داشته باشند و بر علیه موجودات زنده مضر مانند باکتری ها، ویروس ها و قارچ ها به کار روند. تحولات نانو فناوری، با افزایش میزان سود مندی و کاهش عوارض سموم کشاورزی، معضلات ناشی از این سموم را رفع می کند و آنها را به محصولاتی مفید تبدیل می کند (Poor Rahim., 2011).

مکانیسم ذرات نانو بخصوص نانو ذرات نقره علیه باکتری ها شامل: تغییر دیواره سلولی و سیتوپلاسم (Lysakowska et al., 2013)، تغییر نفوذپذیری غشا و تنفس سلولی (Manjumeena et al., 2014)، تغییرات مورفولوژیکی، جدا شدن غشای سیتوپلاسمی از دیواره سلولی (پلاسمولیز) (Tamayo et al., 2014)، تغییر سطوح ATP بین سلولی و مختل کردن تکثیر DNA می باشد (Shrivastava et al., 2009). اثر مختل کنندگی کلی نانو ذرات علیه گونه های باکتریایی ممکن است در نتیجه ی خسارت به آزیب های باکتریایی و غشای سیتوپلاسمی باشد. مرگ سلول های باکتریایی از طریق های آسیب دیدن متابولیتی و تراوش محتوای سیتوپلاسم به اطراف ناشی می شود (Lia et al., 2006). نسبت بالای سطح به حجم ، توانایی آنها را برای نفوذ به غشاهای سلولی و امکان تغییر فعالیت شیمیایی افزایش می دهد (Dubchak et

2010)، گلرنگ (*Carthamus tinctorius L.*) عضو از خانواده کومپوزیته یا آسترا سه محسوب می شود که عمدتاً به عنوان دانه روغنی کشت می شود. همچنین از گلهای آن به عنوان منبع رنگ و نیز دارو در طب گیاهی استفاده می شود (Ekin, 2008). Zhang et al., (1997) با مطالعه خصوصیات آنتی اکسیدانی ترکیبات کنجاله حاصل از روغن گیری دانه گلرنگ هفت ترکیب از مشتقات سروتونین را با خاصیت آنتی اکسیدانی قوی در آن شناسایی کردند. این ترکیبات جز گروه آمیدهای اسید اندول هیدروکسی سینامیک محسوب می شود و گزارش شده است از قدرت آنتی اکسیدانی بالایی در شرایط *in Vitro* برخوردار هستند و اثرات بیولوژیکی مختلفی از خود بر وضعیت لیپیدها در پلاسما و کبد بروز می دهند (Koyama et al., 2006). Salem et al. (2010) با بررسی روند تغییرات ترکیبات فنلی در طول دوره رشد گیاه گلرنگ نشان دادند گل های این گیاه می تواند به عنوان منبع خوبی از ترکیبات زیست فعال مورد استفاده قرار گیرد. پژوهش حاضر به بررسی فعالیت ضد قارچی نانوذرات نقره بوسنتزی با استفاده از عصاره آبی گل های گیاه گلرنگ (*Carthamus tinctorius*) در کنترل بیماری پوسیدگی ریشه ناشی از قارچ *Fusarium solani f. sp. phaseoli* در گیاه لوبیا می پردازد.

مواد و روش ها

برای این پژوهش از گیاهان آلوده به بیماری پوسیدگی ریشه لوبیا نمونه هائی تهیه شد. نمونه برداری در هر مزرعه به صورت زیگزاگی و به طور تصادفی از بوته های دارای علائم بیماری انجام شد (Singleton., 1992) و نمونه ها پس از جمع آوری به درون کیسه های پلاستیکی منتقل و پس از نصب برچسب مشخصات به آزمایشگاه بیماری شناسی منتقل شدند. گیاه در محل طوقه از ساقه جدا شده و پس از شستشو با آب جاری قطعاتی از آن تهیه و به مدت ۳ دقیقه با محلول هیپوکلریت سدیم ۱ درصد ضد عفونی سطحی شدند و برای حذف محلول هیپوکلریت سدیم اضافی، قطعات در سه مرحله با آب مقطر استریل شسته

و pH آن‌ها به ترتیب در (۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹) تنظیم شد. از تمامی نمونه‌ها طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی گرفته و در نهایت pH بهینه با توجه به ماکزیمم طول جذب جهت سنتز انتخاب شد. برای تنظیم pH از یکی از دو محلول سدیم هیدروکسید یا هیدروکلریک اسید با غلظت ۰/۱ مولار استفاده شد. جهت بررسی تاثیر مقدار حجم عصاره مصرفی و بهینه سازی آن، مقادیر ۱ تا ۱۰ میلی لیتر از عصاره به ۱ میلی لیتر از نمک نیترات نقره با غلظت ۱ میلی مولار افزوده و pH آن برابر pH بهینه تنظیم و از تمامی محلول‌های حاصل طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی گرفته شد و در نهایت حجم بهینه با توجه به ماکزیمم طول جذب انتخاب گردید. برای بررسی تاثیر غلظت یون نقره بر سنتز نانوذرات نقره و بهینه نمودن آن، مقدار بهینه شده از حجم عصاره به ۴ میلی لیتر از محلول نمک نیترات نقره با غلظت‌های (۱، ۲، ۳، ۴ و ۵) میلی مولار افزوده و از تمامی محلول‌ها طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی گرفته و غلظت بهینه با توجه به ماکزیمم طول جذب انتخاب شد. جهت بررسی تاثیر افزایش دما بر سنتز نانوذرات نقره و بهینه نمودن آن، محلول‌هایی با اعمال تمامی شرایط پیشین ساخته و به صورت جداگانه در دمای ۳۰، ۴۰، ۵۰، و ۶۰ درجه سانتی‌گراد (در حمام آب گرم) قرار داده و طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی تمامی آن‌ها گرفته شد و دمای بهینه با توجه به ماکزیمم طول جذب انتخاب گردید. جهت بررسی اثر زمان بر سنتز نانوذرات نقره و بهینه نمودن آن، محلول حاصل از اعمال تمامی شرایط بهینه شده در زمان‌های مختلف (از لحظه مخلوط واکنشگرها تا ۱ ساعت پس از آن) ساخته و از هر کدام به صورت مجزا طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی گرفته و زمان بهینه با توجه به ماکزیمم طول جذب انتخاب شد. برای جداسازی نانو ذرات سنتز شده از عصاره گیاه محلول واکنشی با دور ۱۴ هزار دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و در هر مرحله فاز رویی دور ریخته شد و آب مقطر استریل جایگزین آن شد و این عمل ۲-۴ بار تکرار گردید (Sathyavathi et al., 2010). رسوبات نانو ذرات نقره به دست آمده از سانتریفیوژ در دمای

شدند (Chimbekujwo et al., 1999). سپس در شرایط استریل قطعات به تشتک پتری حاوی محیط کشت PDA اسیدی منتقل و تا زمان رشد در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از گذشت چند روز پرگنه‌های حاصل به روش تک اسپور خالص سازی شده و از آنها پرپاراسیون موقت تهیه و زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت. همچنین قطر رشد پرگنه و رنگ و سایر مشخصات میکروسکوپی و ماکروسکوپی نیز بررسی شدند. جدایه تهیه شده، با استفاده از کلید نلسون و همکاران (Nelson et al., 1983) مورد بررسی قرار گرفت و مشخصات آن با گونه *Fusarium solani f.sp. phaseoli* مطابقت داشت. بر اساس نتایج حاصل از بررسی‌های میکروسکوپی و طبق منابع موجود، جدایه‌ها تحت عنوان گونه *F. solani* معرفی شدند. جهت سنتز نانوذرات مقداری از گل‌های گیاه گلرنگ پس از شستشو با آب دوبار تقطیر، به دور از نور خورشید و در درجه حرارت اتاق خشک شدند. سپس بخش‌های خشک شده توسط آسیاب برقی پودر گردید. برای سنتز نانو ذرات، از روش جوشاندن با حلال آبی استفاده گردید. در این روش میزان ۵ گرم از گل‌های خشک شده گیاه گلرنگ (*Carthamus tinctorius*) در یک ارلن مایر حاوی ۱۰۰ میلی لیتر (mL) آب دوبار تقطیر ریخته شد و در دمای ۶۰ درجه سلسیوس گراد به مدت ۱۵ دقیقه جوشانده شد. پس از عصاره گیری، برای یکنواختی بیشتر عصاره، یکبار با استفاده از کاغذ واتمن شماره ۱ و یکبار با استفاده از فیلتر سر سرنگی ۰/۲۲ میکرومتر (μm) فیلتر گردید. برای حذف کامل ذرات معلق موجود در عصاره، نمونه توسط سانتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. عصاره فیلتر شده تا زمان مصرف در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Sathyavathi et al., 2010). برای بدست آوردن نانو ذراتی با شکل و اندازه مطلوب، پارامترهای موثر بر سنتز نانوذرات نقره مانند؛ pH عصاره، حجم عصاره، غلظت یون نقره، دما و زمان واکنش بهینه شدند و مورد مطالعه قرار گرفتند. جهت بررسی تاثیر pH و بهینه سازی آن، ۶ سری محلول حاوی عصاره و محلول نمک نیترات نقره با غلظت ۱ میلی مولار ساخته

قارچ فوزاریوم (*Fusarium solani f. sp. phaseoli*)، بذرها را استریل شده لوبیا با نانوذرات سنتز شده در غلظت های ۴۰۰، ۶۰۰ و ۸۰۰ پی پی ام آغشته شده و کشت شدند. تیمارهای مورد بررسی شامل شاهد سالم، شاهد آلوده با قارچ فوزاریوم و شاهد آغشته به نانونقره سنتزی با غلظت های ۴۰۰، ۶۰۰ و ۸۰۰ پی پی ام محلول نانونقره سنتزی بودند که هر یک به عنوان یک تیمار در نظر گرفته شد و هر تیمار شامل ۱۰ گیاهچه بود. ارزیابی بیماری زایی جدایه ها توسط شاخص ارزیابی شدت بیماری روی ریشه گیاه براساس شاخص ۵ درجه ای پیشنهاد شده برای فوزاریوم مولد پوسیدگی ریشه لوبیا در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی با ۱۰ تکرار انجام شد (Van Schoonhoven et al., 1987). پوسیدگی ریشه که بر اساس شاخص بیماری مورد بررسی قرار میگیرد به صورت: شاخص صفر = ریشه گیاه سالم و بدون لکه؛ ۱ = لکه ها کوچک و جدا از هم، یا لکه ها کمتر از ۲۵ درصد ناحیه هیپوکوتیل را پوشانده است؛ ۲ = لکه ها بهم پیوسته، یا لکه ها بین ۲۵ تا ۵۰ درصد هیپوکوتیل را پوشانده است؛ ۳ = لکه ها در ناحیه پوست عمیق، یا لکه ها بین ۵۰ تا ۷۵ درصد هیپوکوتیل را پوشانده است؛ ۴ = لکه ها از حالت قبلی عمیق تر بوده و گاهی تا نزدیکی استوانه مرکزی می رسد، یا لکه ها بیش از ۷۵ درصد هیپوکوتیل را می پوشاند. ارزیابی میزان اثر بازدارندگی ها پس از ۲۰ تا ۳۰ روز بعد مورد بررسی قرار گرفت و گیاهان مایه زنی شده با جدایه قارچ بیمارگر *Fusarium solani f. sp. phaseoli* پس از ۳-۴ هفته جهت ارزیابی شدت بیماری مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج تجزیه واریانس با استفاده از نرم افزار SPSS ارزیابی گردید و میانگین داده های بدست آمده با استفاده از نرم افزار SAS با آزمون چند دامنه ای دانکن مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت انجام آزمون های مزرعه ای، مزرعه ای که به بیماری پوسیدگی ریشه لوبیا آلوده بود انتخاب شد. برای بررسی تأثیر نانوذرات بر روی علائم و بیماری زایی قارچ فوزاریوم (*Fusarium solani f. sp. phaseoli*)، بذرها را استریل شده لوبیا با نانوذرات سنتز شده در غلظت های ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ پی پی ام آغشته شده و کشت شدند. در خصوص آزمون بیماری زایی در

محیط به مدت یک شبانه روز قرار داده شد تا خشک شوند (Shameli et al., 2012). برای تایید نانو ذرات بیوسنتزی به دست آمده از طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی، اندازه و شکل نانوذرات سنتز شده توسط تکنیک های پراش پرتو ایکس (X-ray diffraction: XRD)، طیف سنجی مادون قرمز (FT-IR) و میکروسکوب الکترونی عبوری (TEM) مورد بررسی قرار گرفت. FTIR یک ابزار قدرتمند برای شناسایی انواع پیوندهای شیمیایی در یک مولکول با تولید یک طیف جذبی مادون قرمز است که مانند یک "اثر انگشت" مولکولی است (Senapati., 2005). همچنین FTIR می تواند به منظور اثبات حضور یک مولکول پروتئینی در محلول در محدوده خاصی مورد استفاده قرار گیرد (Senapati et al., 2005). هدف اصلی FTIR در این مطالعه به منظور تعیین گروه های عاملی شیمیایی در نمونه ها بوده است.

جهت انجام آزمون درون شیشه ای و بررسی فعالیت اثر نانوذرات روی رشد پرگنه قارچ *Fusarium solani f. sp. phaseoli* در محیط کشت PDA، دیسک های قارچی به قطر ۳ میلی متر از کشت های جوان قارچ های مورد آزمون توسط اسکالپل تهیه شد و در قسمت مرکزی ظرف پتری حاوی محیط کشت PDA قرار گرفت. بعد از ۴۸ ساعت قارچ ها رشدی با قطر حدود ۱/۵ سانتی متر داشتند. سپس ۵۰۰ میکرولیتر از غلظت های (۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ پی پی ام) نانو نقره بیوسنتزی در محیط کشت بر روی قارچ های رشد کرده ریخته شد و ظروف پتری در دمای آزمایشگاه نگه داری شدند. میانگین رشد قارچ ها به مدت ۴ روز به طور روزانه مورد بررسی قرار گرفت و هاله رشدی قارچ ها اندازه گیری شد. متغیرهای مستقل مورد بررسی شامل فاکتور نانوذرات در ۵ سطح غلظتی (شامل غلظت های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ پی پی ام عصاره) و یک کنترل شامل کنترل منفی (محیط کشت PDA) بود. این بررسی به صورت یک آزمایش فاکتوریل ۱×۶ در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم افزار SPSS، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. جهت انجام آزمون های در شرایط گلخانه ای، برای بررسی تأثیر نانوذرات بر روی علائم و بیماری زایی

همچنین ناشی از ارتعاشات پلاسمون سطحی در نانوذرات می باشد (Sastry *et al.*, 2003). بر اساس آنالیز اسپکتروفتومتریک محلول نانوذره نقره سنتزی توسط گیاه گلرنگ مشاهده پیک در محدوده ۴۲۰-۴۱۰ نانومتر دلیلی برای اثبات تولید نانوذرات نقره بیوسنتز شده می باشد.

در بررسی پارامترهای موثر بر سنتز نانوذرات نقره مانند؛ pH عصاره، حجم عصاره، غلظت یون نقره، دما و زمان واکنش، نتایج نشان داد، در بررسی تاثیر pH، پس از اضافه کردن عصاره گلرنگ به نمک نیترات نقره، مقدار pH محلول حاصل توسط دستگاه pH متر، ۴/۲ اندازه گیری شد. به منظور مطالعه تاثیر pH بر سنتز نانوذرات، pH های کمتر و بالاتر از مقدار اولیه مورد بررسی قرار گرفت (۴، ۵، ۶، ۷، ۸ و ۸/۵ = pH) در ۴ = pH تغییری در جذب ملاحظه نشد به طوری که می توان گفت، سنتزی در این pH انجام نگرفت. اما با افزایش تدریجی میزان pH محلول تا ۸، جذب محلول به صورت چشمگیری افزایش یافت که مربوط به افزایش در مقدار سنتز نانوذرات نقره است. در ۸ = pH طیفی متقارن با بیشترین مقدار جذب نسبت به سایر pH ها، مشاهده شد اما در pH بالاتر (۸/۵ = pH) افت شدیدی در میزان جذب ملاحظه شد. در نتیجه مقدار ۸ = pH به عنوان pH بهینه جهت سنتز نانو ذرات انتخاب شد. در بررسی تاثیر مقدار حجم عصاره مصرفی بر روند سنتز نانو ذرات نقره، ملاحظه شد با افزایش میزان حجم عصاره جذب مربوط به نانوذرات نقره افزایش چشمگیری یافت که این خود نشان دهنده افزایش در میزان سنتز نانوذرات با افزایش میزان حجم عصاره می باشد. این افزایش تا ۸ میلی لیتر از عصاره ادامه داشت اما از ۸ میلی لیتر بالاتر، افت شدیدی در میزان جذب مشاهده شد. در نتیجه میزان ۸ میلی لیتر از عصاره به عنوان حجم بهینه جهت سنتز نانو ذرات انتخاب شد. در بررسی مقدار یون فلزی بر روند سنتز نانو ذرات نقره ملاحظه شد که با افزایش تدریجی در میزان غلظت یون نقره، جذب مربوط به نانوذرات نقره کاهش چشمگیری داشت. این کاهش با افزایش غلظت ها ادامه داشت. در نتیجه مقدار غلظت ۱ میلی مولار از

شرایط مزرعه نمونه های مورد بررسی شامل شاهد آلوده با چارچ فوزاریوم، شاهد آغشته به نانوقره سنتزی با غلظت های ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ پی پی ام محلول نانوقره بیوسنتزی و شاهد آغشته به نانوقره سنتزی با غلظت های ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ پی پی ام محلول نانوقره سنتزی به همراه چسب سریش گیاهی بودند (هدف از استفاده از چسب سریش گیاهی به خاطر چسبندگی بیشتر نانوذرات بیوسنتزی به بذر لوبیا می باشد) که هر یک به عنوان یک تیمار در نظر گرفته شد و هر تیمار شامل ۱۰ گیاهچه بود. ارزیابی بیماری زایی جدایه ها توسط شاخص ارزیابی شدت بیماری روی ریشه گیاه براساس شاخص ۵ درجه ای پیشنهاد شده برای فوزاریوم مولد پوسیدگی ریشه لوبیا در قالب طرح آماری بلوک کامل تصادفی با ۳ تکرار انجام شد (Van Schoonhoven *et al.*, 1987). مناسبترین زمان ارزیابی بیماری در مراحل سبز شدن (V1)، گل دهی (R6) و پر شدن غلاف ها (R8) است. چون ارزیابی یک بار انجام شد مرحله گلدهی انتخاب شد (Abawi *et al.*, 2006). در نهایت پس از جدا شدن خاک اطراف ریشه ها، کلاس بیماری با اعداد ۰-۴ نمره داده شدند (Van Schoonhoven *et al.*, 1987). نتایج تجزیه واریانس با استفاده از نرم افزار SPSS ارزیابی گردید و میانگین داده های بدست آمده با استفاده از نرم افزار SAS با آزمون چند دامنه ای دانکن مورد ارزیابی قرار گرفت.

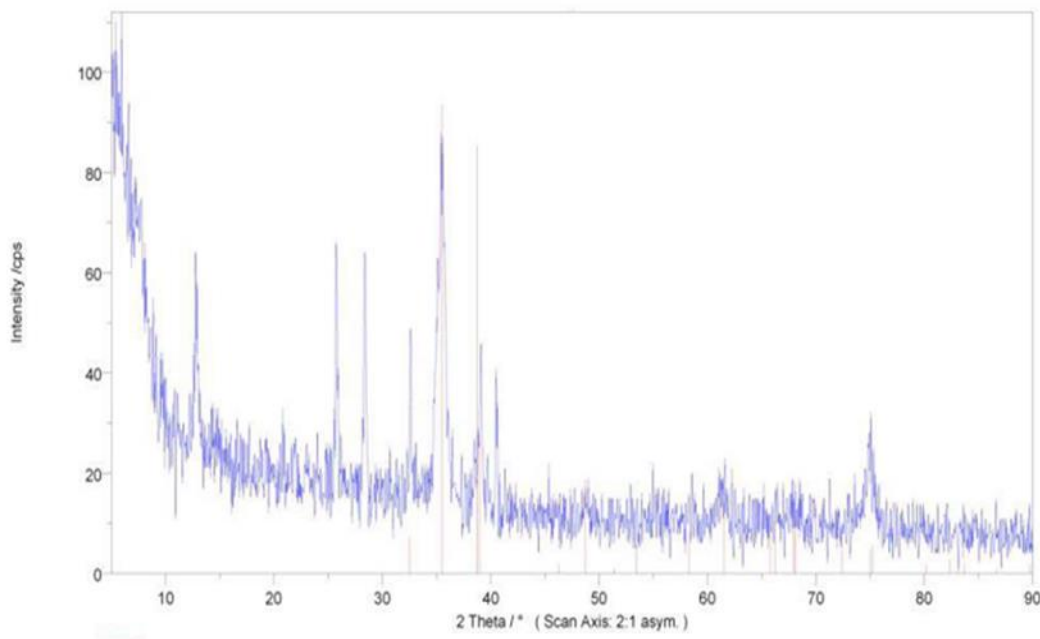
نتایج

برای بهینه سازی پارامترهای موثر بر سنتز نانوذرات در سنتز اولیه با استفاده از عصاره گل های گلرنگ (*Carthamus tinctorius*) با اضافه کردن نمک نیترات نقره به عصاره آبی گلرنگ محلول شروع به تغییر رنگ از حالت نارنجی به حالت قهوه ای تیره کرد، که این تغییر رنگ حاکی از تولید نانوذرات نقره و ناشی از تحریک ارتعاشات پلاسمون سطحی در نانوذرات فلزی است در حالیکه در نمونه ای که بدون نیترات نقره (کنترل مثبت) بود تغییر رنگ مشاهده نشد. پیدایش رنگ قهوه ای در محلول حاوی عصاره آبی گلرنگ، یک نشانه واضح برای تشکیل نانوذرات نقره در محلول واکنشی عصاره آبی و محلول نیترات نقره و

افزایش می یابد، اما از زمان ۲۰ دقیقه به بعد، تغییر محسوسی در مقدار این جذب مشاهده نشد که این مشاهده، پایدار بودن نانوذرات حاصل را ثابت می کند. در نتیجه، زمان ۲۰ دقیقه به عنوان زمان بهینه جهت سنتز نانو ذرات انتخاب شد. پیک های مشاهده شده در محلول عصاره گیاهی مورد مطالعه در بازه های زمانی مختلف و همچنین نبودن آثاری از ته نشین شدن بعد از چند هفته پس از واکنش دلیلی بر پایدار بودن نانوذرات تولید شده می باشد.

به منظور بررسی خلوص نانو ذرات سنتز شده طیف پراش پرتو ایکس مورد بررسی قرار گرفت. پرتو طیف XRD تشکیل نانو ذرات نقره را مورد تأیید قرار داد (شکل ۱).

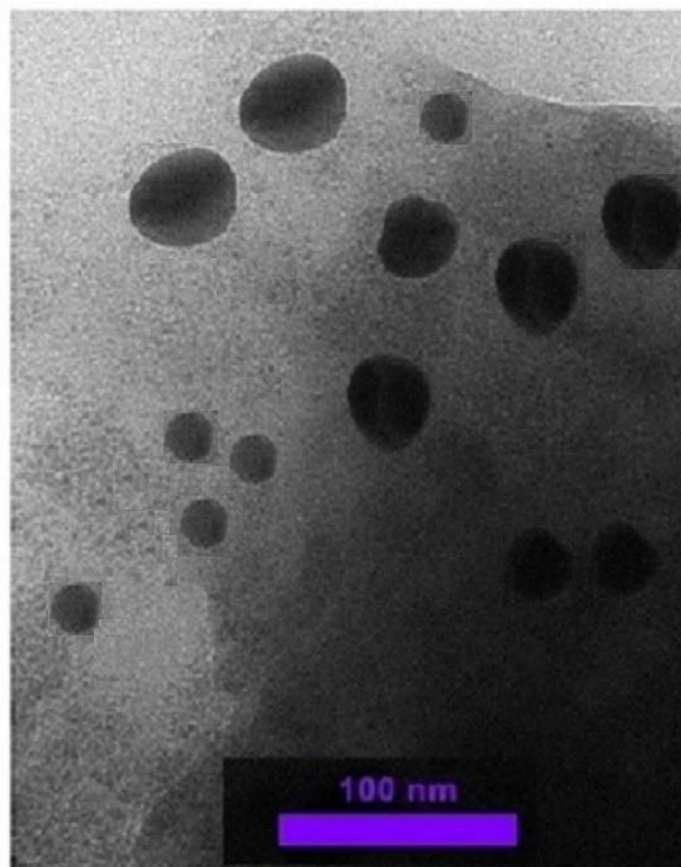
نمک نیترات نقره به عنوان غلظت بهینه و مناسب جهت سنتز نانو ذرات انتخاب شد. در بررسی تأثیر دما بر روند سنتز نانوذرات نقره، مشاهده شد که با افزایش تدریجی دما، میزان جذب به صورت محسوسی افزایش یافت. اما این روند افزایش تا دمای ۵۰ درجه سانتی گراد بوده و در دمای بعد از آن (۶۰ درجه سانتی گراد)، کاهش قابل توجهی در جذب دیده شد، در نتیجه با افزایش بیش از حد دما، سنتز نانوذرات کاهش خواهد یافت. لذا دمای ۵۰ درجه سانتی گراد به عنوان دمای مطلوب جهت سنتز نانو ذرات انتخاب شد. نتایج بررسی تأثیر زمان مجاورت محلول نیترات نقره با عصاره گیاه بر روند واکنش نتایج نشان می دهد که با افزایش زمان برهمکنش میان واکنشگرها از لحظه اول، مقدار جذب



شکل شماره ۱. تصویر پراش پرتو ایکس نانوذرات نقره سنتز شده
Figure 1. X-ray diffraction image of synthesized silver nanoparticles

نشان می دهد (شکل ۲). نانوذرات به دست آمده همگی تقریباً کروی بوده و اندازه متوسط آن ها بین ۸-۱۲ نانومتر است.

نتیجه بررسی میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM): تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری نانوذرات نقره سنتز شده با اعمال تمامی شرایط بهینه شده را



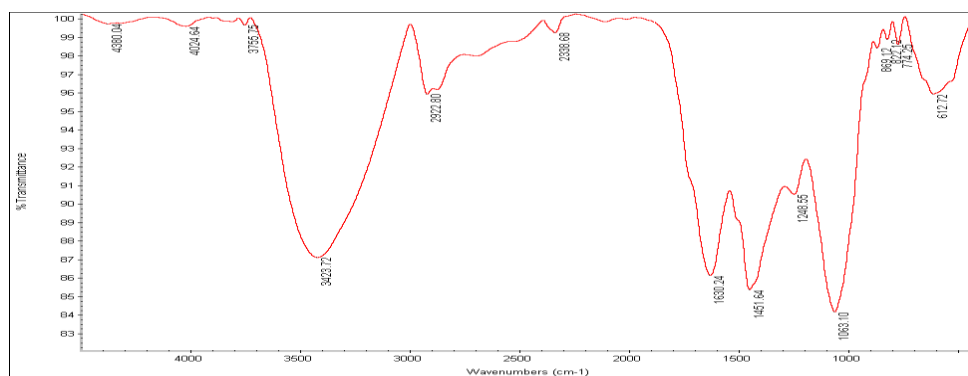
شکل شماره ۲. تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) نانو ذرات نقره سنتز شده

Figure 2. Transmission electron microscope (TEM) image of synthesized silver nanoparticles

می باشند (Sanghi, 2009). طیف FTIR در اطراف محدوده 1058 cm^{-1} ، 1249 cm^{-1} ، 1451 cm^{-1} ، 1513 cm^{-1} و 1651 cm^{-1} نشان دهنده وجود گروههای پیوندی آمید در نمونه است که وجود پیک در نمونه های حاصل از پژوهش حاضر در محدوده 1060 cm^{-1} ، 1402 cm^{-1} ، 1631 cm^{-1} مشابه آنالیز هنری و همکاران (Honary *et al.*, 2013) می باشد.

باندهای قابل رویت بین محدوده 500 cm^{-1} – 750 cm^{-1} در حال حاضر به گروه R-CH که در محلول نیترات نقره به همراه عصاره آبی گلرنگ پیدا شده مربوط می شوند که در آنالیز نمونه موجود نیز پیک در محدوده 619 cm^{-1} مشابه این نتایج است. پیک 767 cm^{-1} مربوط به باند C-CL است که با پیک در این نمونه در محدوده 770 cm^{-1} تا حدودی زیادی مشابه آن است (Hemath *et al.*, 2010).

نتیجه بررسی طیف جذبی FT-IR حاصل از عصاره آبی گلرنگ (Aqueous *Carthamus tinctorius* extract) در (شکل ۳) نشان داده شده است. طیف های نماینده نانوذرات پیک های عبور در محدوده 400 cm^{-1} – 4000 cm^{-1} را نشان می دهند. پیک های مشاهده در این نمونه در محدوده های 3376 cm^{-1} ، 2936 cm^{-1} ، 1633 cm^{-1} ، 1384 cm^{-1} ، 1208 cm^{-1} و 653 cm^{-1} قرار گرفتند، که در میان آنها حداکثر جذب در حدود 3447 cm^{-1} مربوط به وجود پیوند O-H کششی است که در آنالیز نمونه حاضر پیک حاصل در محدوده 3376 cm^{-1} قرار دارد که مشابه نتایج لوو و همکاران (Luo *et al.*, 2005) است. جذب FTIR در اطراف محدوده 2124 cm^{-1} – 2872 cm^{-1} به معنای وجود پیوندهای C-H کششی متقارن و غیرمتقارن مربوطی به حالت های آلیفاتیک و آروماتیک نمونه ها می باشد که در پژوهش حاضر نیز وجود پیک در محدوده 2967 cm^{-1} مشابه نتایج سانقی

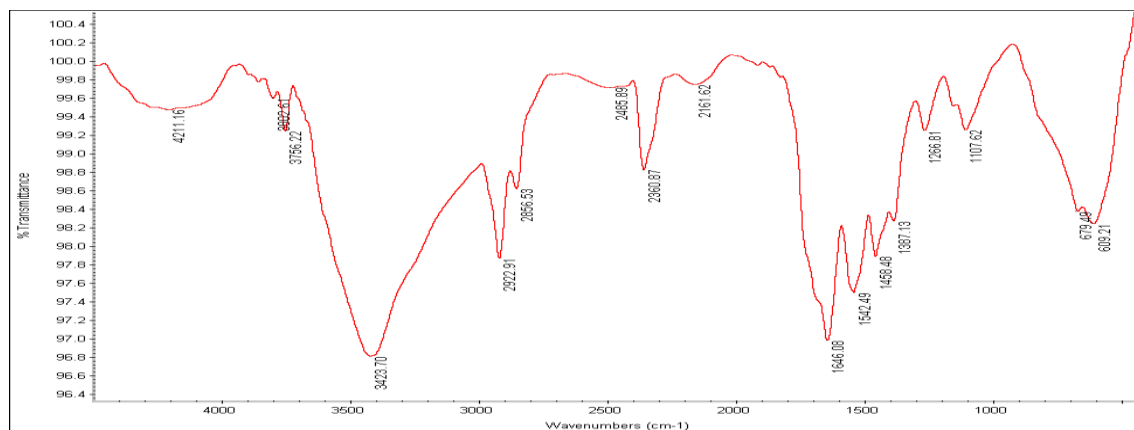


شکل شماره ۳. آنالیز طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز عصاره آبی گلرنگ

Figure 3. Fourier transform infrared spectroscopy analysis of Aqueous extract *Carthamus tinctorius*.

نشان دهنده وجود گروه‌های پیوندی آمید در نمونه است (Honary *et al.*, 2013) که وجود پیک در نمونه های حاصل از پژوهش حاضر در محدوده 1631 cm^{-1} ، 1402 cm^{-1} ، 1060 cm^{-1} هنری و همکاران (Honary *et al.*, 2013) می باشد. وجود باند در اطراف محدوده $2922\text{--}2161\text{ cm}^{-1}$ به معنای وجود پیوندهای کششی C-H متقارن و غیر متقارن مربوط به حالت های آلیفاتیک و آروماتیک نمونه ها می باشد که در پژوهش حاضر نیز وجود پیک در محدوده 2967 cm^{-1} با نتایج سانقی (Sanghi, 2009) مطابقت دارد. پیک در محدوده 3423 cm^{-1} مربوط به وجود پیوند O-H کششی بود. که در آنالیز نمونه حاضر پیک در محدوده 3400 cm^{-1} نیز با نتایج هنری و همکاران (Honary *et al.*, 2013) همخوانی دارد.

نتیجه بررسی نمونه طیف جذبی FT-IR نانوذرات حاصل از بیوسنتز عصاره آبی گیاه گلرنگ نیز بعد از احیاء زیستی در (شکل ۴) نشان داده شده است. پیک های مشاهده در این نمونه در محدوده های 3400 cm^{-1} ، 2936 cm^{-1} ، 1633 cm^{-1} ، 1384 cm^{-1} و 1028 cm^{-1} معلوم کرد باندهای قابل رویت بین محدوده $500\text{--}750\text{ cm}^{-1}$ در حال حاضر به گروه R-CH که در محلول نیترات نقره به همراه عصاره آبی گلرنگ پیدا شده مربوط می شوند که در آنالیز نمونه موجود نیز پیک در محدوده 534 cm^{-1} مشابه آنالیز سرکار و همکاران (Sarkar *et al.*, 2011) می باشد. طیف FTIR از نانو ذرات نقره نشان می دهد که پیک جذب آشکار نانو ذرات در محدوده 1107 cm^{-1} ، 1266 cm^{-1} ، 1387 cm^{-1} و 1646 cm^{-1} ، 1458 cm^{-1} ، 1542 cm^{-1} و 1646 cm^{-1}



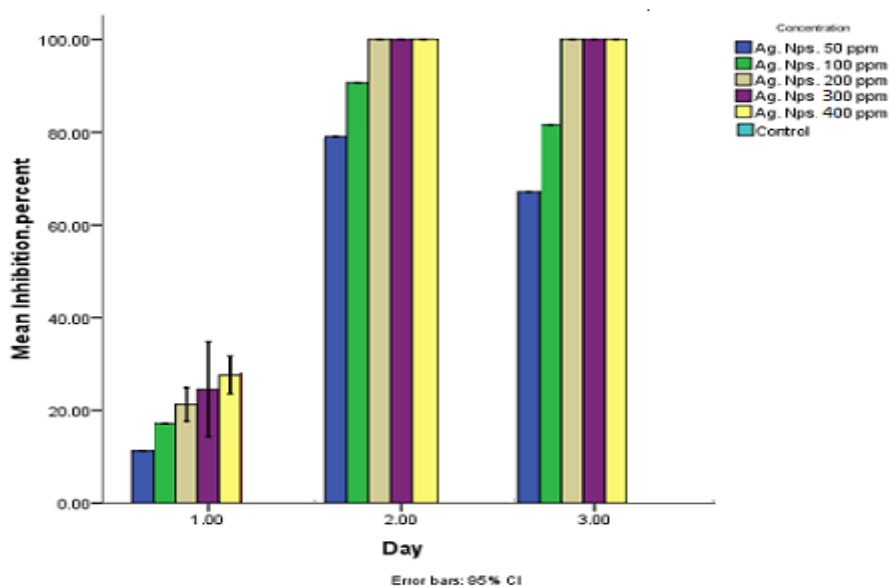
شکل شماره ۴. آنالیز طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز محلول نیترات نقره به همراه عصاره آبی گلرنگ

Figure 4. Fourier transform infrared spectroscopy analysis of silver nitrate solution with aqueous of *Carthamus tinctorius* extract

فعالیت ضد میکروبی نانوذرات نقره تهیه شده توسط این گیاه روی قارچ *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* صورت گرفت و مشخص شد که نانوذرات در غلظت های مختلف دارای تاثیرات متفاوتی در مهار کنندگی قارچ فوزاریوم داشتند و با افزایش میزان غلظت محلول، درصد مهار شدگی قارچ نیز افزایش یافت. مشاهدات نشان داد کمترین درصد بازدارندگی (بیشترین میزان رشد قارچ پاتوژن روی محیط کشت) نسبت به تیمار شاهد سالم مربوط به تیمار نانوذرات نقره بیوسنتزی با غلظت ۵۰ ppm و بیشترین درصد بازدارندگی (کمترین میزان رشد قارچ پاتوژن بر روی محیط کشت) مربوط به تیمارهای نانوذرات نقره بیوسنتز شده با غلظت ۲۰۰ ppm به بالا بود (شکل ۵).

FTIR برای مشخص کردن پوشش Agent ها (عوامل بازدارنده) استفاده شد و معلوم شد که گروه های آمید و کربونیل در محلول های حاوی نانوذرات نقره وجود دارند. این پوشش ها از تجمع نانوذرات جلوگیری می کنند و در پایداری و ثبات آنها در محیط کشت سهم مهمی دارند (Kumar et al., 2007). نتایج به دست آمده حاکی از آن است که گیاه گلرنگ (*Carthamus tinctorius*) توانایی تولید نانوذرات نقره را دارد.

در مقایسه اثرات کاربرد غلظت های مختلف از نانو ذرات نقره سنتز شده توسط گلرنگ (*Carthamus tinctorius*) در کنترل قارچ فوزاریوم، غلظت های ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ پی پی ام در شرایط آزمایشگاهی دارای بهترین اثر در مهار کنندگی قارچ فوزاریوم بودند.



شکل ۵. مقایسه اثر نانو ذرات نقره با غلظت های مختلف (۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ پی پی ام) بر روی رشد میسلومی قارچ

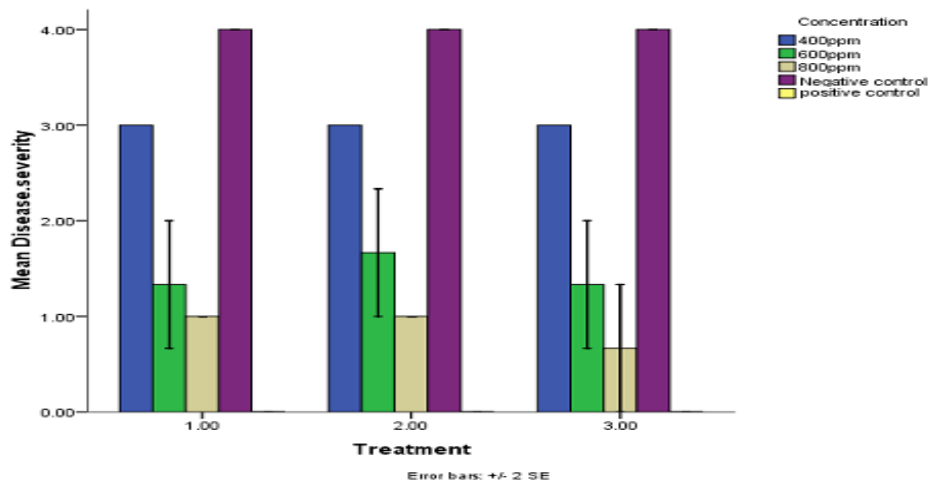
Fusarium solani f.sp. *phaseoli* در محیط کشت PDA

Figure 5. Comparison of the inhibitory effect of silver nanoparticles with different concentrations (50,100,200,300,400PPM) on the mycelial growth of *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* in PDA culture medium

بیش از سایر تیمارها بود. نتایج ارزیابی شدت بیماری بر اساس سیستم ارزیابی سیات (CIAT) ارائه شده بر اساس مقیاس نمره دهی ۴-۰ (توسط Van Schoonhoven et al., 1987) در ناحیه هیپوکوتیل نشان داد تمامی تیمارها در مقایسه با شاهد آلوده باعث کاهش شدت بیماری روی ریشه لوبیا شدند و در

در نتایج بررسی تاثیر نانوذرات نقره بیوسنتزی بر کنترل بیماری پوسیدگی ریشه توسط قارچ *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* در گیاه لوبیا و ارزیابی بیماری زایی تحت شرایط گلخانه، شاهد آلوده دارای میانگین رتبه بالاتری نسبت به سایر تیمارها بود، در نتیجه میزان آلودگی، پوسیدگی ریشه در این تیمار

مقایسه با شاهد سالم، تیمار لوبیا با نانوذره نقره بیوسنتزی گیاه گلرنگ (*Carthamus tinctorius*) با غلظت های ۸۰۰ و ۶۰۰ پی پی ام موجب کاهش شدت بیماری روی ریشه های گیاه لوبیا شدند (شکل ۶).

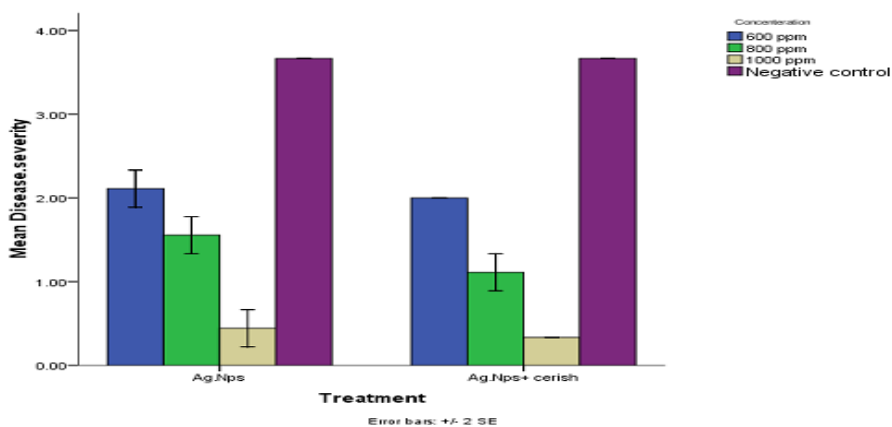


شکل ۶. اثر نانوذرات بیوسنتز شده روی شاخص شدت بیماری روی ریشه های لوبیا در شرایط گلخانه

Figure 6. Effect of biosynthesized nanoparticles on disease severity index on bean roots in greenhouse conditions.

Schoonhoven *et al.*, 1987) در ناحیه هیپوکوتیل نشان داد تمامی تیمارهای نانو ذرات بیوسنتزی به همراه چسب سریش در مقایسه با شاهد آلوده باعث کاهش شدت بیماری روی ریشه لوبیا شدند. تیمار لوبیا با نانوذره نقره بیوسنتزی گیاه گلرنگ (*Carthamus tinctorius*) با غلظت ۱۰۰۰ پی پی ام همراه با چسب سریش، بهترین اثر را نسبت به سایر تیمارها داشت (شکل ۷).

در نتایج بررسی تأثیر نانوذرات نقره بیوسنتزی بر کنترل بیماری پوسیدگی ریشه توسط قارچ *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* در گیاه لوبیا و ارزیابی بیماری زایی در شرایط مزرعه، شاهد آلوده دارای میانگین رتبه بالاتری نسبت به سایر تیمارها بود، در نتیجه میزان آلودگی، پوسیدگی ریشه در این تیمار بیش از سایر تیمارها بود. نتایج ارزیابی شدت بیماری بر اساس سیستم ارزیابی سیات (CIAT) ارائه شده بر اساس مقیاس نمره دهی ۰-۴ (توسط Van



شکل ۷. اثر نانوذرات بیوسنتز شده روی شاخص شدت بیماری روی ریشه های لوبیا در شرایط مزرعه

Figure 7. Effect of biosynthesized nanoparticles on disease severity index on bean roots in field conditions.

بحث

تاثیر چشمگیری نداشته و تنها اندازه آن ها را به میزان زیاد تحت تاثیر قرار می دهد (Gardea *et al.*, 1999; Armendariz *et al.*, 2004). در بررسی این عامل، گزارشات نشان می دهد که در pH های خیلی بالا، یون های نقره هیدرولیز شده، به گونه ای که موجب به وجود آمدن گونه های پایدار هیدروکسیدهای یون نقره می شود و در انتها از ورود این یون ها به واکنش احیای زیستی ممانعت می شود (Supraja *et al.*, 2013). پهن شدن طیف های جذبی در pH های بیشتر، بدین علت است که در اسیدیته های بالاتر نانوذراتی با اندازه بزرگ تر (به علت اتصال ذرات ریز تر به هم) به وجود خواهد آمد که این اتفاق موجب پهن شدن تقریبی طیف ها می شود. پهن شدن طیف ها در اثر افزایش اندازه نانوذرات، پیش از این گزارش شده است (Shenya *et al.*, 2011). بدین دلیل اسیدیته ۸ به عنوان pH بهینه انتخاب شد. مطالعات نشان می دهند که، در غلظت های کمتر از میزان بهینه عامل احیاء کننده و پایدار کننده، عمل احیاء کنندگی و پایدارسازی نانوذرات به صورت کامل اتفاق نیافتاده و نانوذرات به میزان کمتر و با اندازه درشت تری به دست می آید. هم چنین با افزودن مقدار بیشتر از میزان بهینه، ذرات پایدارکننده به دور خود بیشتر تجمع کرده که این عمل موجب می گردد پایدارسازی به طور کامل انجام نشده و ذرات با اندازه درشت تری به دست آید. با بی ثبات شدن نانوذرات، از جمعیت نانوذرات پایدار در محیط کم شده و جذب کاهش خواهد یافت. پژوهش ها حاکی از آن است که با افزایش در اندازه نانوذرات، میزان جذب کاهش یافته و متقابلاً با افزایش در توزیع ذرات، پهنای طیف ها افزایش می یابد (Dubeya *et al.*, 2010; Foroghira *et al.*, 2015). در نتیجه میزان ۸ میلی لیتر از عصاره به عنوان حجم مناسب برای احیای یون های نقره انتخاب شد. پژوهش های متعددی تاثیر غلظت یون فلزی بر سنتز نانوذرات را اثبات کرده اند. مطالعات نشان می دهد با افزایش غلظت یون فلز، جذب مشاهده شده نیز افزایش می یابد که این پدیده بدین علت است که با افزایش مقدار یون فلز، یون های بیشتری احیاء شده و نتیجتاً نانوذرات بیشتری تولید خواهد شد (Dwivedi *et al.*, 2010). اما کاهش بیش از

گیاه گلرنگ با نام علمی *Carthamus tinctorius L.* از خانواده Compositae یکی از گیاهان دارویی علفی یک ساله و یا دو ساله است. علفی، بدون کرک و به رنگ سبز روشن یا مات و متمایل به آبی و ایستاده است که ارتفاع بوته های آن به ۳۰ تا ۶۰ سانتیمتر می رسد و گیاهی تیغدار و رنگ ده به شمار می آید. گل های گیاه زرد یا زرد نارنجی، برگ آن تخم مرغی و سرنیزه ای است. گلرنگ در ایران در اطراف تهران، خراسان، تبریز، نواحی جنوبی و شمال غربی کاشته می شود. آنالیزهای فیتوشیمیایی گل های گلرنگ حاکی از آن است که منبع غنی فلاونوئیدهایی مانند کوئرستین و کامپرفول است و فعالیت آنتی اکسیدانی و هیپوگلیسمیک آن به این ترکیبات ارتباط دارد. احتمالاً فلاونوئیدها مسئول اثر ضد باکتریایی گیاه می باشند. اثبات اثر ضد میکروبی فلاونوئید نتیجه تحقیقاتی است که Harsh *et al.* (1988) بر روی این ماده انجام داده اند. نظر به این که بهترین حلال برای فلاونوئیدها، محلول آبی و الکلی 80°C - 70°C درجه می باشد (et al. 1970) Mabry و نیز مشاهده اثر ضد میکروبی عصاره آبی گیاه، دخیل بودن فلاونوئیدها در اثرات ضد میکروبی در این گیاه را روشن تر می نماید. کوئرستین در زمره فراوان ترین پلی فنل های گیاهی بوده که تحقیقات متعددی در مورد آن انجام پذیرفته است (Salem *et al.*, 2010). این تحقیق بیوسنتز نانوذرات فلزی بر پایه احیای زیستی، توسط عصاره گل های گیاه گلرنگ به عنوان احیاء کننده و پایدارکننده را نشان داد. تولید نانوذرات به این روش به صورت یک مرحله ای و مقرون به صرفه بوده در زمان بسیار کم، فرایند تکمیل می شود. تغییر در رنگ محلول از شفاف به قهوه ای و هم چنین افزایش میزان جذب محلول به دلیل احیاء یون نقره و تجمع آن ها به صورت نانوذرات نقره می باشد.

در بررسی های فاکتورهای موثر بر سنتز نانوذرات نقره، pH یکی از مهم ترین فاکتورهای موثر بر سنتز نانوذرات نقره می باشد (Waghmar *et al.*, 2014). پیش از این گزارش هایی مبنی بر تاثیر pH بر روی چگونگی تشکیل نانوذرات به ثبت رسیده است. گزارش ها حاکی از آن است که pH بر روی شکل نانوذرات

حد یا افزایش نامحسوس در مقدار جذب مربوط به نانو ذرات در اثر افزایش بیش از اندازه غلظت یون نقره، می تواند به دلیل چسبندگی نانو ذرات و سنتز نانو ذراتی با اندازه بزرگ تر باشد (Mock et al., 2002). با توجه به دلایل ذکر شده غلظت ۱ میلی مولاری از یون نقره به عنوان غلظت مناسب انتخاب شد. هم چنین مطالعات حاکی از آن است که دما تأثیر به سزایی بر میزان جذب و اندازه نانو ذرات سنتز شده دارد. مشاهدات نشان می دهد که با افزایش دمای محیط واکنش، مقدار جذب خوانده شده افزایش یافته، اما اندازه نانو ذرات کاهش خواهد یافت (Rai et al., 2010). افزایش دما، احتمال و سرعت برخورد مولکول های احیاء کننده و تثبیت کننده با یون های فلزی را افزایش می دهد به صورتی که بلافاصله پس از عمل احیاء و تثبیت، فرصتی برای اتصال نانو ذرات سنتز شده به یکدیگر و تولید نانو ذرات با اندازه درشت تر وجود نخواهد داشت (Kaviya et al., 2010). اما کاهش در میزان جذب به دلیل افزایش بیش از حد دما می تواند به دلیل تجزیه و یا از بین رفتن تمامی و یا بخشی از ترکیبات احیاء کننده و پایدار کننده در عصاره گیاه باشد. مطالعات پیشین، تخریب ترکیبات موجود در گیاه در اثر افزایش بیش از حد دما را به اثبات رسانیده اند (Basiri et al., 2011). در نتیجه مناسب ترین شکل و اندازه نانو ذرات نقره در این روش در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد به دست خواهد آمد. زمان نیز همانند فاکتورهای مورد بحث، تأثیر به سزایی در سنتز و پایدار بودن نانو ذرات دارد (Praveen Kumar et al., 2011). به طوری که، در واکنش های این چنینی، اگر سنتز کامل انجام نشده باشد، با گذشت زمان تولید نانو ذرات بیشتر خواهد بود. هم چنین عامل زمان، مهم ترین فاکتور برای اثبات پایداری نانو ذرات سنتز شده می باشد. به گونه ای که اگر با گذشت زمان، افزایش قابل توجه ای در میزان جذب نانو ذرات نقره ملاحظه نشود، می توان این گونه استنباط کرد که نانو ذرات حاصل با گذر زمان کاملاً پایدار هستند. با توجه به دلایل عنوان شده، واکنش احیاء یون های نقره توسط عصاره آبی گل های گلرنگ در ۲۰ دقیقه کامل شده است.

طبق مطالعات اندازه، مورفولوژی و غلظت ذرات در فعالیت ضد میکروبی نانو ذرات نقره بسیار تعیین کننده می باشد (Baker et al., 2005). هر چه اندازه ذرات کوچکتر باشد اثر ضد میکروبی نانو ذرات نقره به دلیل افزایش سطح به حجم بیشتر شده و هر چه شکل منظم تر و غلظت بالاتر باشد درجه تأثیر گذاری آنها بالاتر می باشد. ویژگی نانو ذرات نقره از لحاظ شکل و اندازه باعث شده که این نانو ذرات بتوانند با تخریب غشاء فعالیت ضد میکروبی بالایی از خود نشان دهند (Morones et al., 2005). همان طوری که قبلاً اشاره شد، در سنتز زیستی نانو ذرات توسط گیاهان، گیاه نقش احیاء کردن یون های فلزی و هم چنین تثبیت کردن این نانو ذرات را ایفا می کند (Philip et al., 2010). گلرنگ نیز دارای ترکیبات طبیعی فراوانی چون ترکیبات آنتی اکسیدانی، فنل ها و فلاونوئیدها و... می باشد (Zhang et al., 1997). که تمامی این ترکیبات در احیاء یون های فلزی و تبدیل آن ها به اتم های فلزی در ابعاد نانومتریکی و پایدار کردن نانو ذرات سنتز شده نقش مهمی دارند. ترکیبات فنلی به طور گسترده به عنوان ترکیب ضد التهاب و ضد عفونی کننده کاربرد دارد. پس می توان نتیجه گرفت اثرات آنتی قارچی عصاره این گیاه ناشی از وجود این ترکیبات است و کنترل بیماری فوزاریوم گیاه لوبیا توسط قارچ *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* در پژوهش ما بوسیله نانو ذرات نقره بیوسنتزی توسط گیاه گلرنگ (*Carthamus tinctorius*) می تواند ناشی از کاهش جوانه زنی اسپورهای قارچ ها و آسیب دیواره هیف ها باشد. بنا بر این بررسی پتانسیل عصاره گل های گلرنگ می تواند راهکاری برای استفاده موثر از آن و روشی ارزان و زیست سازگار برای تولید نانو ذرات باشد. بررسی انجام شده در این تحقیق نشان داد که عصاره گل های گلرنگ پتانسیل بالایی برای تولید نانو ذرات نقره دارند.

نتیجه گیری کلی

بطور کلی نتایج این پژوهش پتانسیل بالای عصاره آبی گل های گلرنگ را در احیاء یون های فلزی و تبدیل آن ها به اتم های فلزی در ابعاد نانومتریکی را نشان می دهد. و بر اساس نتایج بدست آمده از مجموع هر سه

به موارد دیگر قابل توصیه تر باشد.

آزمایشات در شرایط آزمایشگاهی، گلخانه ای و مزرعه ای و با عنایت به هزینه های تولید کمتر و بدون آلودگی زیست محیطی و تولید سریعتر و آسان تر نانوذرات نقره بیوسنتز شده نسبت به نانوذرات شیمیایی، به نظر می رسد که کاربرد نانوذرات بیوسنتز شده جهت کنترل بیماری فوزاریومی ریشه لوبیا نسبت

سپاسگزاری

از استاد ارجمندم جناب دکتر وحید زرین نیا کمال تشکر و امتنان را دارم.

REFERENCES

1. Abbot , W.S.(1925). A method of computing of the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol*, 8, 265-267.
2. Armendariz V, Herrera I, Peralta videa JR, Jose yacaman M. (2004). Size controlled gold nanoparticle formation by avena sativa biomass use of plants in nanobiotechnology. *J Nanopart Res*, 6, 377 -85.
3. Baker, C.,Pradhan, A.,Pakslis, L. Pochan,Dj,Shah,Sl., (2005). "synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles". *journal of Nano science Nanotechnology*, 5, 244-249
4. Basiri S H.(2011). [Investigation of the effect of temperature and air velocity in the dryer on the amount and quality of essential oil of Thymus]. *Inn Sci Food Technol J*, 4, 73 -82. (Persian)
5. Burke, D. W., and Miller, D. E. (1983). Control of Fusarium root rot with resistant beans and cultural management. *Plant Disease*, 67, 1312- 1317.
6. Burke DW & Hall R.(1991). Fusarium root rot. In: Hall, R. (Ed.), Compendium of Bean Diseases. The American *Phytopathological Society*. (pp. 9-10). Paul, MN
7. Dubey, S. P., Lahtinen, M., Sillanp, M. (2010). Tansy fruit mediated greener synthesis of silver and gold nanoparticles. *Process Biochemistry*, 45 (7), 1065–1071.
8. Dubchak S, Ogar A, Mietelski JW, Turnau K. (2010). Influence of silver and titanium nanoparticles on arbuscular mycorrhiza colonization and accumulation of radiocaesium in Helianthus annuus. *Span Journal Agriculture Research*; 8(1), 103-108.
9. Dubeya S HP, Lahtinen M, Sillanpaa M.(2010). Tansy fruit mediated greener synthesis of silver and gold Nanoparticles . *Proce Biochem*, 45, 1065 -71.
10. Dwivedi AG, Gopol K.(2010). Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using Chenopodium album leaf extracts. *Coll Suf Phys Eng Asp* , 360, 27 -33.
11. Ekin, Z. (2008). Resurgence of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) utilization : A global view. *Journal of Agronomy*, 4(2), 83-87.
12. Foroghira S, Khatibzadeh M.(2015). [Green synthesis of silver nanoparticles used in conductive inks using sonochemical method]. *Iranian J Chem Eng* , 34, 1 -9. (Persian)
13. Gardea -Torresdey JL, Tiemann KJ, Gamez G, Dokken K, Tehuacanero S, Jose - Yacaman M. (1999). Gold Nanoparticles Obtained by Bio -Precipitation from Gold (III) Solutions. *J Nanopart Res*, 1, 397 - 402.
14. Hemath Naveen, K.S., Gaurav Kumar, Karthik, L., Bhaskara Rao, K.V. (2010). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the filamentous fungus *Penicillium* sp. *Archives of Applied Science Research*, 2 (6), 161-167.
15. Honary, S., Barabadi, H., Gharaei-Fathabad, E., and Naghibi, F. (2013). Green Synthesis of Silver Nanoparticles Induced by the synthesis and the characterization of metal substituted magnetites. *Solid State Communications* (vol. 118). (pp. 529-534).
16. Hwang, E.T., Lee, J.H., Chae, Y.J., Kim, Y.S., Kim, B.C., Sang, B.and Gu, M.B. (2008). *Analysis of the toxic mode of action of silver nanoparticles using stress-specific bioluminescent bacteria*. *Small*, 4, 746–750.
17. 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. *Curr Nanosci*, 4, 141–144.
18. Jun, J., Yuan-Yuan, D., Shao-hai, W., Shao-feng, Z. and Zhongyi, W. (2007). Preparation and characterization of antibacterial silver-containing nanofibers for wound dressing applications. *J US China Med Sci*, 4, 52–54.
19. Kaiser, W.j., Danesh, D.,Okkhovat, M. & Mossahebi, G.H. (1968). Disease of pulse crops (edible legumes) in iran .PI. Dis. Repr, 52:681 – ;Iran. *J. Plant Path*,4(3).
20. Karamkash, M., M., rich and young, M. (2006). The application of silver nanoparticles in the control of *plant diseases and pests*. The first nanotechnology conference in the southern region Country, Shiraz University.

21. Kaviya S, Santhanalakshmi J, Viswanathan B. (2010). Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Polyalthia longifolia Leaf extract along with D -Sorbitol study of antibacterial activity. *J Nanotechnol*, 2011, 1 -5.
22. Kawahara, K., Tsuruda, K., Morishita, M. and Uchida, M. (2000). Antibacterial effect of silver zeolite on oral bacteria under anaerobic condition. *Dent Mater*, 16, 452–455.
23. Knetsch, M.L.W. and Leo, H.K. (2011). New strategies in the development of antimicrobial coatings: the example of increasing usage of silver and silver nanoparticles. *Polymers*, 3, 340–366.
24. Koyama, N., Kuribayashi, K., Seki, T., Kobayashi, K., Furuhashi, Y., Suzuki, K. *et al.* (2006). Serotonin derivatives, major safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed antioxidants, inhibit low-density lipoprotein(LDL) oxidation and atherosclerosis in apolipoprotein E-Deficient mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4970-76.
25. Kumar, A.S., Ansary, A.A., Ahmad, A., Khan, M.I. (2007a). Extracellular biosynthesis of CdSe quantumdots by the fungus, *Fusarium oxysporum*. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 3, 190–194.
26. Landsdown, A.B.G. (2002). Silver I: its antibacterial properties and mechanism of action. *J Wound Care*, 11, 125–138.
27. Luo, L.B., Yu, S.H., Qian, H.S., and Zhou, T. (2005). Large-scale fabrication of flexible silver/cross-linked poly (vinyl alcohol) coaxialnanoscale by a facial solution approach. *Journal of the American Chemical Society*, 127(9), 2822–2823. doi, 10.1021/ja0428154.
28. Majnoon Hosseini N. (1997). *Iranian beans*. *University Jihad Publications, University of Tehran*.
29. Maple, P.A.C., Hamilton-Miller, J.M.T. and Brranfltt, W. (1992). Comparison of the in-vitro activities of the topical antimicrobials azelaic and, nitroforazone, silver sulphadiazine and mupirocin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother*, 29, 661–668.
30. Morones, J.R., Elechiguerra, J.L., Camacho, A. and Ramirez, J.T. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16, 2346–2353.
31. Mock JJ, Barbic M, Smith DR, Schultz DA, Schultz S. (2002). Shape effects in Plasmon resonance of individual colloidal silver nanoparticles. *J Chem Phys*, 116, 6755 -9.
32. Nanda, A., Saravanan, M. (2009). Biosynthesis of silver nanoparticles from *Staphylococcus aureus* and its antimicrobial activity against MRSA and MRSE. *Nanomedicine, NBM*, 5, 452–456.
33. Nelson, P.E., (1981). A.A. Bell, and C.H. Becman. (eds.), *Fungal wilt disease of plant*. Academic press, New Yourk, Pp. 5-80.
34. Nikoobakht, B., Wang, J., El-Sayed, M. A. (2002). Surface-enhanced Raman scattering of molecules adsorbed on gold nanorods: offsurface plasmon resonance condition. *Chemical Physics Letters*, 366, 1-2, 17–23.
35. Park, H.J., Sung, H. K., Hwa, J. K., Seong, H. C. (2006). A new composition of nanosized silicasilver for control of various plant diseases. *Journal of Plant Pathology*, 22(3), 295-302.
36. Philip D. (2010). Green synthesis of gold and silver nanoparticles using *Hibiscus rosasinensis*. *Physica E*, 42, 1417 -24.
37. Poor Rahim, Reza . (2011). *Nanotechnology is a powerful tool for sustainable agricultural development*.
38. Praveen Kumar k, Paul W, Chandra P SH. (2007). Green synthesis of gold nanoparticles with *Zingiber officinale* extracts characterization and blood compatibility. *Proce Biochem* , 46, 2007 -13.
39. Rai A, Singh A, Ahmad A, Sastry M. (2006). Role of halide ions and temperature on the morphology of biologically synthesized gold Nano triangles. *Langmuir* , 2, 736 –741.
40. Rajasekharreddy, P., Rani, P. U., Sreedhar, B. (2010). Qualitative assessment of silver and gold nanoparticle synthesis in various plants: a photobiological approach. *Journal of Nanoparticle Research*, 12 (5), 1711–1721.
41. Salem, N., Msaada, K., Hamdaoui, Gh., Limam, F. and Marzou k, B. (2011). Variation in Phenolic Composition and Antioxidant Activity during Flower Development of Safflower(*Carthamus tinctorius* L .). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 4455 –63.
42. Sanghi, R., Verma, P. (2009). Biomimetic synthesis and characterisation of protein capped silver nanoparticle. *Bioresourc Technology*, 100(1), 501-4.
43. Saremi H, Mohammadi J and Okhovvat SM. (2007). Naz, a resistance cultivar on bean root rot disease in Zanjan province, northern Iran. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 72,757-764.
44. Sarkar, J., Chattopadhyay, D., Deo, S.S., Patra, S , Sinha, S., Ghosh, M., Mukherjee, A. (2011). *Alternaria alternata* mediated synthesis of protein capped silver nanoparticles and their genotoxic activity. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 6(2), 563-573.

45. Sarkar, J., Dey P., Saha S., Acharya K. (2011). Myscosynthesis of selenium nanoparticles. *Micro and Nano Letters*, 6, 599–602.
46. Sastry, M., Ahmad, A., Khan, M.I., Kumar, R. (2003). Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and actinomycetes. *Curr Sci*, 85(2), 162-170.
47. Sathyavathi R, Krishna MB, Rao SV, Saritha R, Rao DN. (2010). Biosynthesis of silver nanoparticles using Cori-andrum Sativum leaf extract and their application in nonlinear optics. *Adv Sci Lett*, 3, 1–6.
48. Senapati, S., Ahmed, A., Khan, M.I., Kumar, R. and Sastry, M. (2005). Extracellular biosynthesis of bimetallic Au-Ag alloy nanoparticles. *Small*, 1, 517-520.
49. Shameli, K., Ahmad, M.B., Zamanian, A., Sangpour, P., Shabanzadeh, P., Abdollahi, Y., et al. (2012). Green biosynthesis of silver nanoparticles using Curcuma longa tuber powder. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 5603–5610.
50. Shenya DS, Mathewa J, Philip D. (2011). Phytosynthesis of Au Ag and Au -Ag bimetallic nanoparticles using aqueous extract and dried leaf of Anacardium occidentale. *Acta Mole Biomole Spect*, 79, 254 -62.
51. Shokrzadeh M, Saeedisaravi SS. (2010). The chemistry pharmacology and clinical properties of Sambucus ebulus a review. *J Med Plants Res*, 4, 95 -103
52. Sippell, D. W., and Hall, R. (1982). Effects of pathogen species, inoculum concentration, temperature, and soil moisture on bean root rot and plant growth. *Canadian Journal of plant pathology*, 4, 1-7.
53. Supraja S, Chakravarthy N, Sagadevan K. (2013). Green Synthesis of Silver Nanoparticles from Cynodon dactylon leaf extract. *J Chem Technol Res*, 1, 271 -277.
54. Uskokovic, V. (2008). Nanomaterials and nanotechnologies: approaching the crest of this big wave. *Current Nanoscience*, 4, 119–12.
55. Waghmar SS, Deshmukh AM, Sadowski Z. (2014). Biosynthesis, optimization, purification and characterization of gold nanoparticles. *African J Microbiol Res*, 2, 138 -46
56. Zhang, H.L., Nagatsu, A., Watanabe, T., Sakakibara, J. and Okuyama, H. (1997). Antioxidative compounds isolated from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) oil cake. *Chemical and pharmaceutical bulletin* (Tokyo), 45(12), 1910-14.