

مهار زیستی بیماری پژمردگی فوزاریومی لوبیا با عصاره نانوذره نقره *Trichoderma harzianum*

مهناز کشاورز، مهدی صدروی، محمد عبداللهی

گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران

مسئول مکاتبات: مهدی صدروی، پست الکترونیک: msadravi@yu.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۴/۱۱

۶۷-۵۷ (۲) ۶

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۶/۲۴

چکیده

پژمردگی فوزاریومی ناشی از *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* یک بیماری مهم انواع لوبیا در جهان است. بیماریزایی دو جدایه بیمارگر از جنوب غرب ایران روی سه نوع لوبیای چشم بلبلی، قرمز و چیتی آزمایش شد. سپس برای یافتن روش مناسب مهار زیستی بیماری، درصد بازدارندگی از رشد میسلیم این دو جدایه بیمارگر توسط عصاره جدایه‌های *Trichoderma harzianum* در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد. عصاره جدایه برتر *T. harzianum* با روش مخلوط کردن با محلول نیترات نقره به نانوذره تبدیل و تشکیل ذرات نانو با بررسی طیف جذبی آنها با طیف‌سنجی نوری با اشعه ماوراء بنفش بررسی شد. حداکثر جذب نوری در طول موج ۴۴۰ نانومتر در غلظت ۵ میلی‌مول نیترات نقره مشاهده شد. تأثیر بازدارندگی ده غلظت این ماده نانوذره بر رشد میسلیم جدایه پرآزارتر بیمارگر آزمایش و غلظت EC50 آن ۶۵۰ قسمت در میلیون تعیین شد. همچنین تأثیر غلظت‌های EC30، EC50، EC70 آن، عصاره خالص *T. harzianum* و محلول نیترات نقره، بر شدت بیماری در لوبیا چیتی و قرمز در شرایط گلخانه آزمایش شد. همه تیمارهای این آزمایش باعث کاهش معنی‌دار شاخص شدت بیماری در هر دونوع لوبیا شدند، ولی همه غلظت‌های ماده نانو بیشتر از نیترات نقره و عصاره خالص *T. harzianum* شدت بیماری را کاهش دادند. توانایی مهار زیستی این بیماری با عصاره نانوذره *T. harzianum* برای نخستین بار گزارش می‌شود.

کلمات کلیدی: بیماری گیاهی، پژمردگی، لوبیا قرمز، لوبیا چیتی، لوبیا چشم‌بلبلی، نانوذره

مقدمه

کشت لوبیا در دنیا، به‌طور متوسط ۱۰٪ است (Schwartz et al., 2005). این بیماری در بیشتر مناطق کشت لوبیا در ایران موجب خسارت اقتصادی به محصول می‌شود و در برخی از مناطق در شمال غرب کشور خسارت آن به بیش از ۷۰ درصد نیز می‌رسد (Saremi et al., 2011; Karimian et al., 2010). روش‌های مدیریت بیماری، برقراری تناوب زراعی، از بین بردن بقایای بوته‌های بیمار، ضد عفونی بذر با قارچکش مناسب، شناسایی و کشت رقم مقاوم، کاربرد قارچکش جذبی پای بوته‌ها یا افزودن آن به آب آبیاری پس از بروز اولین نشانه‌های بیماری در مزرعه عنوان شده است (Schwartz et al., 2005). استفاده از قارچکش‌ها برای مدیریت بیماری‌های خاکزاد موجب از بین رفتن ریزجانداران مفید خاک و به هم خوردن تعادل اکولوژیکی می‌گردد، بنابراین توجه روزافزونی به مبارزه زیستی با این

انواع لوبیا شامل لوبیای قرمز (kidney bean)، چیتی (pinto bean) و چشم‌بلبلی (cowpea) با دارا بودن ۲۵-۲۰ درصد پروتئین از مهم‌ترین گیاهان زراعی ایران هستند. سطح زیر کشت لوبیا در ایران معادل ۱۱۰۲۴۸ هکتار با تولیدی معادل ۲۲۵۷۲۰ تن است. مهم‌ترین مناطق کشت لوبیا در ایران استان‌های فارس، لرستان، مرکزی، زنجان و چهارمحال و بختیاری هستند (Khaghani et al., 2012).

پژمردگی فوزاریومی ناشی از *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* J.B. Kendr. & W.C. Snyder یک بیماری خاکزاد مهم و شایع انواع لوبیا در جهان می‌باشد. این بیماری باعث کوتولگی، زردی برگ‌ها، پژمردگی و ریزش برگ‌ها، قهوه‌ای شدن بافت‌های آوندی ساقه و در نهایت از بین رفتن بوته‌ها می‌شود. خسارت بیماری در اغلب مناطق

Cladosporium، *Botrytis cinerea* Pers.، Sacc.،
Pythium و *cladosporioides* (Fresen.) G.A. de Vries،
ultimum Trow استفاده شده است (Park et al., 2006).
 بنابراین بیشتر تلاش‌ها برای تولید زیستی مواد نانو با اتم نقره
 متمرکز شده است (Seabra & Durán, 2015). تولید مواد
 نانو در گیاهان و قارچ‌ها مورد تحقیق قرار گرفته است و
 وجود نانوذرات نقره، نیکل، کبالت، روی و مس در گیاهان
 یونجه، آفتابگردان، خردل هندی (Indian mustard)،
 به شکل مواد ترپنوییدی، فلاونی، کتونی، آلدیدی، آمیدی
 و اسیدهای کربوکسیلیک تشخیص داده شده است. از
 عصاره بعضی قارچ‌ها، مانند *Fusarium oxysporum*
 Schltdl. نیز نانوذرات نقره تولید شده است (Al-Samarrai,
 2012). از ۷۵ جدایه پنج گونه *Trichoderma* از جمله
harzianum برای تولید زیستی نانوذرات نقره استفاده شده
 است (Devi et al., 2013). نانوذره نقره از جدایه‌ای از
harzianum تولید شده و تأثیر آن بر قارچ *Sclerotinia*
sclerotiorum عامل کپک سفید سویا مورد آزمایش قرار
 گرفته است (Guilger et al., 2017). تأثیر عصاره نانوذره
 نقره جدایه‌ای از این قارچ نیز بر رشد پرگنه جدایه‌ی مقاوم
 به داروی باکتری *Staphylococcus aureus* آزمایش شده
 است (Gupta et al., 2017). نانوذره نقره تولید شده از
 عصاره جدایه‌ای از قارچ *T. harzianum* در هند باعث
 افزایش جوانه‌زنی بذر آفتابگردان و سویا شده است (Shelar
 and Chavan, 2015).

این پژوهش با هدف تعیین اثر عصاره جدایه‌های ایرانی
T. harzianum بر بازدارندگی از رشد عامل بیماری
 پژمردگی لوبیا و امکان مهار این بیماری با نانوذره نقره
 تولیدی از عصاره مؤثرترین جدایه این قارچ انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری، جداسازی و شناسایی قارچ عامل بیماری

از مزارع لوبیای حومه شهرستان یاسوج شامل مناطق
 چنارستان و شاه‌مختار بازدید و از بوته‌های دچار زردی،
 پژمردگی و قهوه‌ای شدن آوند ساقه نمونه برداری به عمل

گونه بیماری‌های خاکزاد با استفاده از قارچ‌های آنتاگونیست
 مخصوصاً گونه‌های *Trichoderma* شده است. گونه‌های
Trichoderma از عوامل مؤثر مهارزیستی بیمارگرهای
 گیاهی خاکزاد از جمله گونه‌های *Fusarium* هستند
 (Hermosa et al., 2012). از بین گونه‌های *Trichoderma*،
 گونه خاک‌زی *Trichoderma harzianum* Rifai بیش از
 سایرین برای مبارزه با بیمارگرهای خاکزاد مانند گونه‌های
Fusarium استفاده شده و کارآیی خود را نشان داده است
 (Benitez et al., 2004). برخی گونه‌های *Trichoderma* با
 تولید متابولیت‌هایی رشد میسلیم قارچ‌های بیمارگر را
 محدود کرده و با تولید آنزیم‌هایی دیواره‌ی ریشه آن‌ها را
 تخریب می‌کنند. این قارچ‌ها هم‌چنین سازوکارهای دفاعی
 گیاه را تقویت می‌کنند و با تحریک تولید هورمون‌ها باعث
 افزایش رشد گیاهان می‌شوند. آنها هم‌چنین با رقابت
 تغذیه‌ای قوی به راحتی ریزوسفر را تسخیر کرده و مانع
 رسیدن بیمارگر به ریشه می‌شوند (John et al., 2010). بر
 اساس گزارش‌ها، این قارچ به خوبی شدت بیماری پژمردگی
 فوزاریومی گوجه‌فرنگی (Padmodaya & Reddy, 1996;
 Osuinde et al., 2002) و بیماری پوسیدگی فوزاریومی
 ریشه لوبیا را کاهش داده است (Akrami et al., 2009).
 مبارزه زیستی با استفاده از گونه‌های *Trichoderma* هنگامی
 که به صورت تیمار بذر بکار روند به کاهش وقوع
 پژمردگی‌های فوزاریومی کمک می‌کند (Carvalho et al.,
 2011).

نانوتکنولوژی یعنی تولید و بهره‌برداری از موادی که
 اندازه‌ی آن‌ها ۱۰۰-۱ نانومتر است. تولید زیستی اشاره به
 روندی دارد که توسط یک جاندار، یک نانوماده تولید
 می‌شود (Zhang et al., 2011). از بین فلزات، نانو نقره تأثیر
 ضد میکروبی بیشتری از خود نشان داده است. نانوذرات نقره
 باعث متلاشی شدن دیواره سلول‌های ریشه قارچ‌های
 بیمارگر گیاهی *Rhizoctonia solani* Kohn، *Sclerotinia*
sclerotiorum (Lib.) de Bary و *Sclerotinia minor*
 Jagger شده است (Min et al., 2009). هم‌چنین نانوذرات
 نقره با غلظت ۱۰ قسمت در میلیون با موفقیت برای مهار
 عوامل بیماری‌زای گیاهی *Pyricularia grisea* Cooke ex

بازدارندگی از رشد میسلیمی دو جدایه بیمارگر *Fop1* (از چنارستان) و *Fop2* (از شاهمختار) با قرار دادن پرگنه قارچ روی محیط سیب زمینی دکستروز آگار حاوی شش رقت ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۵٪ عصاره هر جدایه *T. harzianum* و نگهداری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و اندازه گیری قطر پرگنه آن‌ها پس از هفت روز تعیین شد. میزان رشد پرگنه جدایه‌های بیمارگر در محیط‌های حاوی و فاقد عصاره محاسبه و درصد بازدارندگی رقت‌های مختلف عصاره چهارجدایه *T. harzianum* مذکور تعیین شد. این آزمایش به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام و داده‌های به دست آمده با نرم افزار SPSS20 تجزیه و تحلیل و مقایسه میانگین با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال ۵٪ انجام شد.

تولید نانوذره از عصاره میسلیمی *T. harzianum*

غلظت‌های نیترات نقره شامل ۵، ۸، ۱۰، ۱۲، ۱۵، ۱۸، ۲۰، ۲۵، ۳۰ میلی مولار به نسبت مساوی با عصاره میسلیمی غلظت ۳۵٪ جدایه برتر T42 عصاره قارچ مخلوط و در آب دو بار تقطیر تهیه شدند. این غلظت‌های نیترات نقره به نسبت‌های مساوی با عصاره قارچ مخلوط و در تاریکی در دمای ۲۷ درجه سلسیوس نگهداری شدند. برای نمونه شاهد از عصاره قارچ بدون نیترات نقره استفاده شد. پس از ۷۲ ساعت تشکیل ذرات نانو با بررسی طیف جذبی نمونه‌ها با طیف سنجی نوری با اشعه ماوراءبنفش در طول موج ۷۰۰-۴۰۰ نانومتر بررسی شد. پس از مشخص شدن غلظت با جذب بالاتر محلول مورد نظر در میکروتیوب‌های ۲ میلی لیتری ریخته شده و به مدت ۱۰ دقیقه با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۲۵ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد و سپس محلول رویی دور ریخته شد و به میکروتیوب‌ها به منظور شست و شو و جداسازی ذرات ته نشین شده آب دیونیزه دو بار تقطیر اضافه شد و سه بار دیگر سانتریفیوژ شدند. سپس رسوب ته نشین شده درون شیشه ساعت در شرایط کاملاً سترون زیر هود میکروبیولوژی به مدت ۱۲ ساعت نگهداری شد تا خشک شد، آنگاه نانوذره تولید شده به وسیله اسکالپل پودر شد (Vahabi et al., 2011). از پودر نانو ذره تولید شده رقت‌های ۳۰۰، ۵۰۰، ۷۰۰، ۹۰۰، ۱۰۰۰، ۱۳۰۰، ۱۵۰۰،

آمده. نمونه‌ها در کیسه پلاستیکی به آزمایشگاه منتقل و پس از شستشوی بافت بیمار با آب و ضد عفونی سطحی با محلول هیپوکلریت سدیم نیم درصد روی محیط سیب زمینی دکستروز آگار (PDA)، بیمارگر، جداسازی و به روش تک اسپور خالص سازی شد. شناسایی قارچ بیمارگر با مطالعه خصوصیات ریخت شناسی آن صورت گرفت (Saremi et al., 2011; Karimian et al., 2010; Leslie & Summerell, 2006).

اثبات بیماری زایی جدایه‌های بیمارگر

بیماری زایی دو جدایه بیمارگر روی سه نوع لوبیای چیتی، قرمز و چشم بلبلی اثبات گردید. برای این منظور، ابتدا گیاهان در گلدان‌ها کشت شدند. پس از چهارده روز نگهداری در گلخانه با دمای ۲۵ درجه سلسیوس، گیاهچه‌ها در مرحله دو برگچه‌ای، با تزریق ۴ میلی لیتر سوسپانسیون به غلظت 3×10^6 اسپور قارچ در هر میلی لیتر آب مقطر سترون به پایین ساقه هر بوته لوبیا مایه زنی شدند. نشانه‌های بیماری هفت روز پس از مایه زنی در لوبیاهای قرمز و چشم بلبلی و پس از چهارده روز روی لوبیا چیتی مشاهده شدند. شاخص شدت بیماری بر اساس درصد برگ‌های زرد و پژمرده شده پس از ۵۲ روز یادداشت برداری شد (Karimian et al., 2010). قارچ بیمارگر از بافت بوته‌های بیمار روی محیط سیب زمینی دکستروز آگار جداسازی و خصوصیات ریخت شناسی آن با قارچ مایه زنی شده مقایسه شد. داده‌های به دست آمده با نرم افزار SPSS20 به صورت آزمایش فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار و با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

اثر عصاره جدایه‌های *T. harzianum* بر رشد پرگنه جدایه‌های بیمارگر در شرایط آزمایشگاه

عصاره پرگنه کشت هفت روزه چهار جدایه‌ی 36، 39، 42، 43 *T. harzianum* در محیط سیب زمینی - دکستروز مایع پس از گذراندن از کاغذ صافی سترون و سه بار سانتریفیوژ (۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه) و گذراندن از فیلتر میکروبیولوژی سترون به قطر ۰/۲۲ میکرومتر تهیه شد (Shelar & Chavan, 2015). تأثیر

معادل EC70 نانوذره- بیمارگر، غلظت معادل EC30 نانوذره- بدون بیمارگر، غلظت معادل نانوذره EC50- بدون بیمارگر، غلظت معادل EC70 نانوذره- بدون بیمارگر، شاهد بدون نانوذره- بیمارگر، شاهد بدون نانوذره- بدون بیمارگر، با چهار تکرار برای هر تیمار در گلخانه انجام شد. پنجاه و دو روز پس از مایه‌زنی بیمارگر، شدت بیماری بر اساس شاخص درصد برگ‌های زرد شده و طولی از ساقه که آوندهای آن قهوه‌ای شده بودند، اندازه‌گیری شد. داده‌های جمع‌آوری شده با نرم‌افزار SPSS 20 با طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار تجزیه و تحلیل و میانگین داده‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه شد.

نتایج

شناسایی بیمارگر و آزمون اثبات بیماری زایی جدایه‌های آن

قارچی با پرگنه‌ای کرک‌دار با سطحی سفیدرنگ و پشت آن به رنگ بنفش روشن با ماکروکنیدیوم‌های قایقی شکل چهار سلولی نسبتاً باریک، میکروکنیدیوم‌های یک سلولی بیضی یا قله‌ای شکل و کلامیدوسپوره‌های قهوه‌ای رنگ، تکی یا جفت، انتهایی یا بین سلولی، کروی شکل با دیواره صاف تا کمی زیر و دیواره ضخیم از بافت بیمار لوبیا جداسازی و براساس این صفات ریختی و نوع میزبان *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* تشخیص داده شد (Leslie & Summerell, 2006).

دو جدایه بیمارگر از لحاظ توان بیماری‌زایی اختلاف معنی‌داری با هم نشان ندادند. همچنین، شدت بیماری بین انواع لوبیا در سطح احتمال ۵ درصد دارای اختلاف معنی‌دار بود و لوبیای چشم‌بلبلی با کمترین شدت شاخص بیماری نسبت به لوبیاهای چیتی و قرمز، حساسیت کمتری نشان داد. شدت بیماری در دو نوع لوبیای چیتی و قرمز به یک اندازه ولی بیش‌تر از لوبیا چشم‌بلبلی بود (شکل ۱).

تأثیر عصاره جدایه‌های *T. harzianum* بر رشد پرگنه جدایه‌های بیمارگر

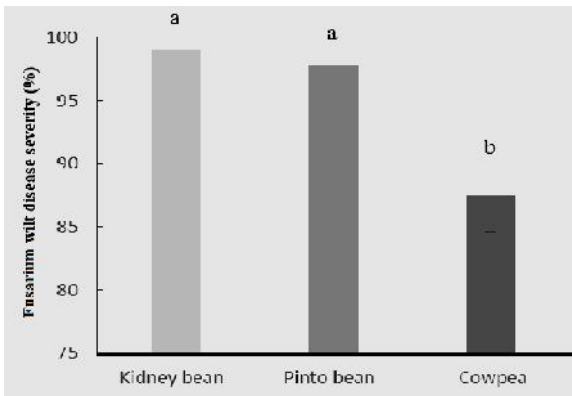
عصاره جدایه‌های *T. harzianum* از لحاظ بازدارندگی بر هر دو جدایه بیمارگر اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند.

۱۷۰۰، ۱۹۰۰ و ۲۰۰۰ قسمت در میلیون تهیه و هر کدام از این رقت‌ها شده با ۱ میلی‌لیتر محلول نانوذره با ۱۹ میلی‌لیتر از محیط کشت سیب‌زمینی- دکستروز- آگار مخلوط و سپس درون تشتک پتری ۸ سانتی‌متری ریخته شد. در شاهد از آب مقطر سترون استفاده شد. پس از انعقاد محیط‌ها از حاشیه کشت هفت روزه قارچ بیمارگر یک پرگنه ۵ میلی‌متری برداشته و در وسط هر تشتک پتری قرار داده شد. پس از هفت روز، زمانی که پرگنه قارچ بیمارگر تشتک پتری شاهد را پر کرد، قطر پرگنه‌ها اندازه‌گیری شد و درصد بازدارندگی محاسبه شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام شد. تجزیه‌ی آماری داده‌ها با نرم‌افزار SPSS20 و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ صورت گرفت. غلظت‌های معادل EC50، EC30، EC70، این ماده نانو به ترتیب معادل ۱/۱۵۵، ۱/۶۵۰، ۲۷۳۰ قسمت در میلیون محاسبه و در آزمایش گلخانه مورد استفاده قرار گرفتند.

تأثیر عصاره نانو *T. harzianum* بر شدت بیماری در گلخانه

بذرهای ضدعفونی شده دو لوبیای چیتی و قرمز که از آزمون اثبات بیماری‌زایی حساس‌تر به بیماری شناخته شدند، کاشته شدند و هر دو روز یک‌بار آبیاری شدند و پس از گذشت ده روز، در مرحله دو برگچه‌ای گیاهچه‌ها با محلول نانوذره در سه غلظت EC30، EC50، EC70، محلول نیترات نقره و عصاره خالص جدایه برتر T42 به صورت جداگانه تیمار شدند. گیاهچه‌های شاهد با آب مقطر سترون تیمار شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت مایه تلقیح جدایه پرآزارتر قارچ بیمارگر تهیه شد و چهار میلی‌لیتر از سوسپانسیون $10^6 \times 3$ اسپور آن در هر میلی‌لیتر آب مقطر سترون در پایین ساقه در نزدیکی طوقه به گیاهچه‌ها تزریق شد. این آزمایش به صورت طرح فاکتوریل در قالب طرح آماری کاملاً تصافی انجام شد. آزمایش با ده تیمار شامل محلول نیترات نقره پنج میلی‌مول- بیمارگر، عصاره خالص *T. harzianum*- بیمارگر، غلظت معادل EC30 نانو ذره- بیمارگر، غلظت معادل EC50 نانوذره- بیمارگر، غلظت

به قهوه‌ای مشاهده شد که نشان‌دهنده‌ی تولید نانو ذرات نقره بود. جذب نانوذرات تولید شده در محدوده طول موج ۷۰۰-۴۰۰ نانومتر با حداکثر جذب در طول موج ۴۴۰ نانومتر ثبت شد.



شکل ۱- واکنش سه نوع لوبیا به بیماری پژمردگی فوزاریومی

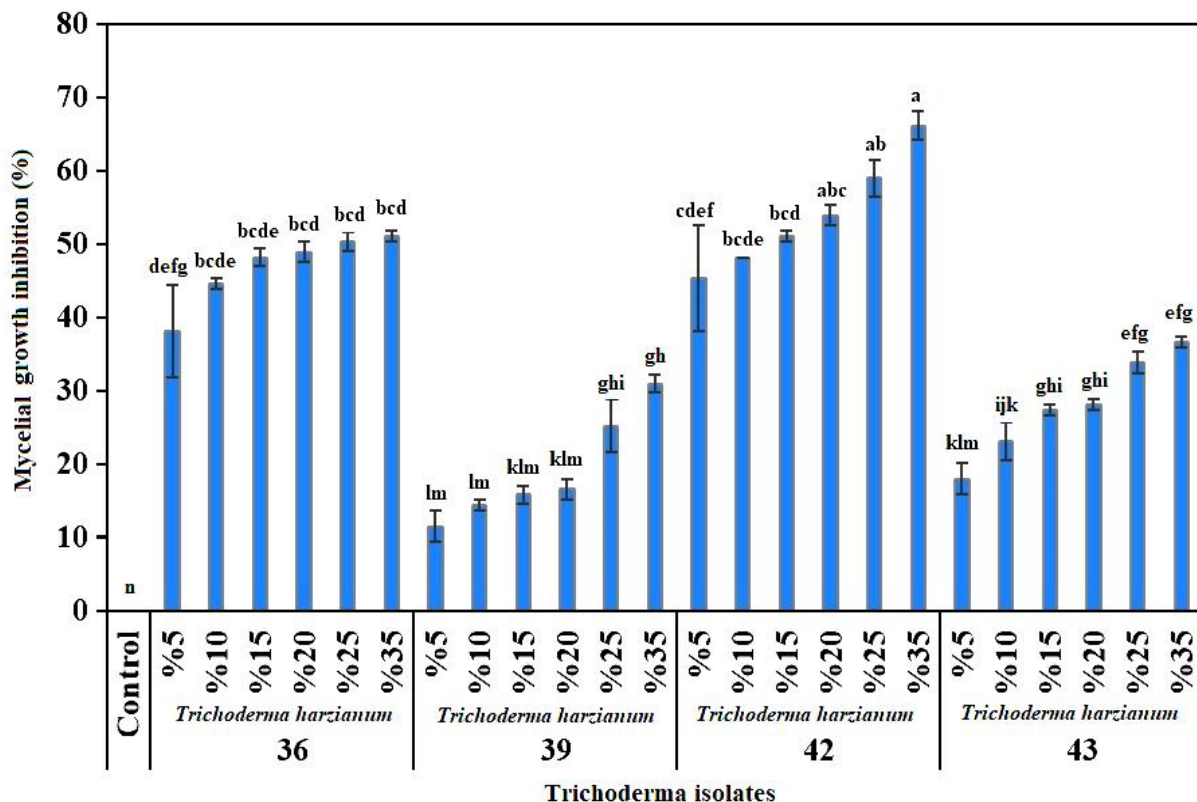
ناشی از *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*.

Fig. 1. Reactions of three kinds of beans to Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*.

بنابراین واکنش هر دو جدایه بیمارگر به این عصاره‌ها یکسان بود. با این حال عصاره جدایه های مختلف تریکودرما اختلاف معنی داری با هم داشتند و عصاره جدایه 42 بیشترین اثر بازدارندگی از رشد پرگنه بیمارگر نشان داد و با افزایش غلظت عصاره این جدایه قطر پرگنه بیمارگر کاهش و میزان بازدارندگی از رشد پرگنه افزایش یافت. پس از آن به ترتیب جدایه‌های 36، 42، 39 و 43 باعث کاهش معنی دار رشد پرگنه بیمارگر شدند. مقایسه قطر پرگنه رشد کرده با قطر پرگنه شاهد نشان داد که با افزایش غلظت عصاره *T. harzianum* قطر پرگنه کاهش و میزان بازدارندگی از رشد پرگنه بیمارگر افزایش یافته است (شکل ۲).

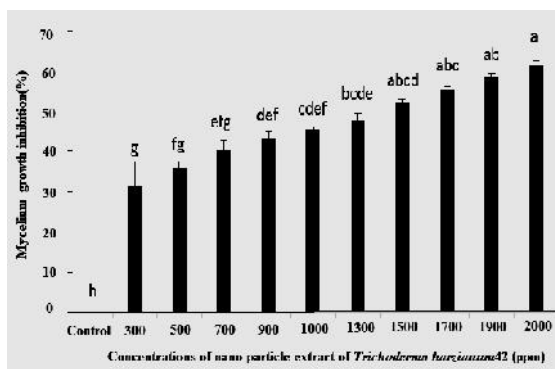
تأثیر نانوذره نقره *T. harzianum* بر رشد پرگنه بیمارگر در شرایط آزمایشگاهی

با افزودن غلظت‌های مختلف نیترا نقره با عصاره خالص جدایه 42 *T. harzianum*، تغییر رنگ محلول از زرد



شکل ۲- تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره چهار جدایه *Trichoderma harzianum* بر رشد میسلیم قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* عامل پژمردگی فوزاریومی لوبیا.

Fig. 2. Different concentrations of *Trichoderma harzianum* isolates' mycelium extracts on mycelial growth of *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*.



شکل ۴- تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره نانو نقره *Trichoderma harzianum*42 بر رشد میسلیم قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* عامل پژمردگی فوزاریومی لوبیا.

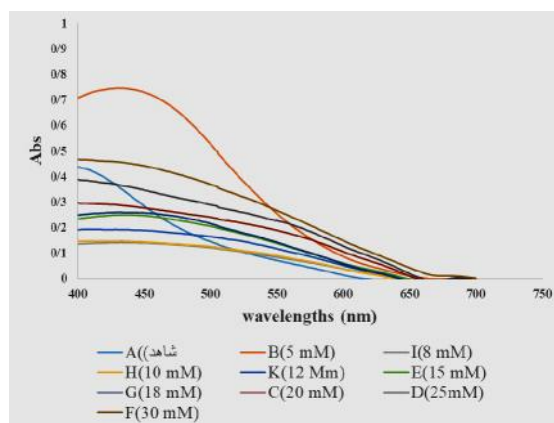
Fig. 4. Impact of different concentrations of silver nano-particle of *Trichoderma harzianum* mycelium extract on mycelium growth of *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*.

تأثیر عصاره نانو *T. harzianum* بر شدت بیماری در گلخانه

علائم بیماری شامل زردی برگها و قهوه‌ای شدن آوندها، ۵۲ روز پس از تلقیح بیمارگر به خوبی در همه تیمارها مشاهده شد (شکل ۵). تأثیر تیمارها بین دو رقم لوبیا معنی داری نبود ولی همه تیمارها باعث کاهش معنی دار هر دو شاخص شدت بیماری شدند. بیماری که اثر بالاتری را در کاهش میزان پژمردگی آوندی داشت غلظت EC70 نانوذرات نقره تولید شده از عصاره T42 و پس از آن EC50، که با EC30 اختلاف معنی دار نداشت ولی با عصاره خالص T42 اختلاف داشت. نیترا نقره اثر کمتری در کاهش میزان آلودگی داشت که با تیمار شاهد مثبت و بقیه تیمارها اختلاف معنی دار داشت (شکل ۶). بنابراین در بین این تیمارها همه غلظتهای ماده نانو که در یک گروه آماری قرار گرفتند، اثر بالاتری در کاهش شدت بیماری داشتند و پس از آنها عصاره خالص T42 و سرانجام محلول نیترا نقره قرار داشتند.

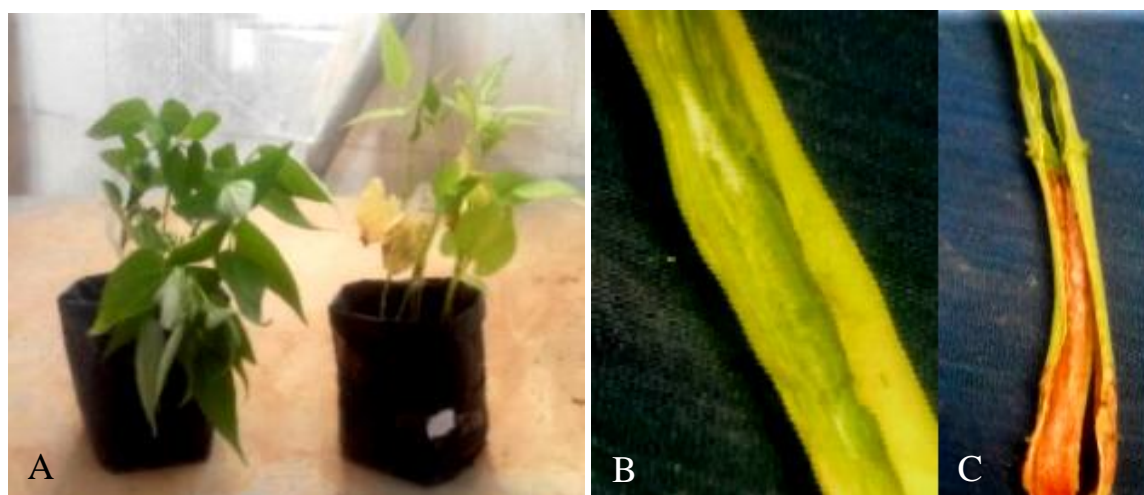
طیف جذبی مربوط به تشکیل نانوذرات نقره با استفاده از عصاره قارچ، بهترین و پایدارترین جذب با غلظت ۵ میلی مول نیترا نقره پس از ۷۲ ساعت داشت (شکل ۳)، که از همین رقت برای آزمایش گلخانه‌ای استفاده شد.

بین درصد بازدارندگی از رشد میسلیم غلظت‌های مختلف محلول نانوذره تولید شده در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی دار وجود داشت و با افزایش غلظت نانوذرات، میزان بازدارندگی از رشد قارچ بیمارگر در محیط افزایش یافت. درصد بازدارندگی همه رقت‌های نانوذرات با شاهد اختلاف معنی دار داشتند و با افزایش غلظت ماده نانو، بازدارندگی از رشد قارچ بیمارگر افزایش یافت (شکل ۴). بنابراین ماده نانو تولید شده در رقت ۶۵۰ قسمت در میلیون توانایی بازدارندگی ۵۰ درصدی از رشد پرگنه این قارچ بیمارگر را دارا بود.



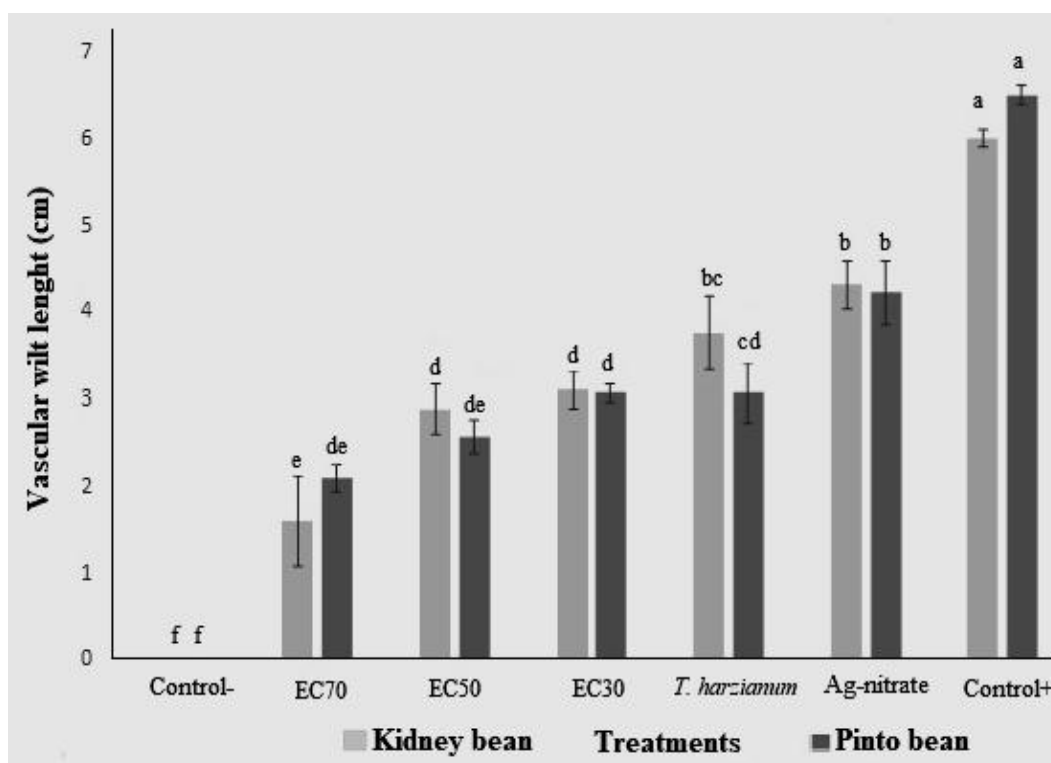
شکل ۳- طیف جذبی غلظت‌های مختلف نانوذره نقره سنتز شده از عصاره میسلیم قارچ *Trichoderma harzianum* 42، به دست آمده از طیف سنجی نوری با اشعه ماوراء بنفش.

Fig. 3. Absorption spectra of various concentrations of silver nanoparticles synthesized from *Trichoderma harzianum* 42 mycelium extract, from UV visible spectroscopy.



شکل ۵- نشانه های بیماری پژمردگی فوزاریومی لوبیا در تیمارهای شاهد سالم و تلقیح شده با *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* در گلخانه: A- بوته سالم (چپ) و بوته با برگ های زرد شده بیمار (راست)، B- مقطع عرضی ساقه بوته سالم، C- مقطع عرضی ساقه بوته تلقیح شده.

Fig. 5. Symptoms of Fusarium wilt disease of bean in healthy and inoculated plants with *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* in greenhouse: A- Healthy plant (left) and diseased plant with yellowish leaves (right), B- Stem cross section of healthy plant, C- Stem cross section of diseased plant.



شکل ۶- تاثیر غلظت های مختلف نانوذره نقره از عصاره *T. harzianum*42، عصاره خالص *T. harzianum*42 و نیترات نقره بر میزان پژمردگی آوندی لوبیا ناشی از *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*.

Fig. 6. Impact of different concentrations of silver nanoparticles from extract of *T. harzianum*42, pure extract of *T. harzianum*42 and silver-nitrate on vascular wilt of bean caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*.

بحث

رنگ به قهوه‌ای تغییر یافت که نشان‌دهنده‌ی تشکیل نانوذرات نقره از عصاره قارچ بود. از جدایه‌های *T. harzianum* در کشور هند نیز برای تولید نانوذرات نقره با موفقیت استفاده شده است (Devati et al., 2013). نانوذره نقره تولید شده از عصاره جدایه‌ای از *T. harzianum* تاثیر بازدارندگی از جوانه‌زدن سختینه‌ها و رشد میسلیم قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* عامل کپک سفید سویا، بدون اثر نامطلوبی روی ریشه سویا، داشته است (Guilger et al., 2017). تاثیر بیشتر ماده نانوذره تولیدی از جدایه‌ای از *T. harzianum* در مقایسه با عصاره خالص آن و نیترات نقره در بازدارندگی از رشد جدایه مقاوم به داروی باکتری بیماری-زای انسان *Staphylococcus aureus* نیز به اثبات رسیده است (Gupta et al., 2017). در این پژوهش با سنتز نانوذره نقره به وسیله عصاره جدایه *T. harzianum* 42 و کنترل بیماری پژمردگی آوندی لوبیا در آزمایشگاه و گلخانه نشان داده شد که این نانوذره می‌تواند تاثیر مثبتی در کنترل این بیماری داشته باشد.

References

- Akrami, M., Ibrahimov, A.S., Zafari, D.M. & Valizadeh, E. 2009. Control of Fusarium rot of bean by combination of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma asperellum* in greenhouse condition. *Agricultural Journal*, 4: 121–123.
- Al-Samarrai, A.B.M. 2012. Nanoparticles as alternative to pesticides in management plant diseases- A Review. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 2: 261–264.
- Benítez, T., Rincón, A.M., Limón, M.C. & Codon, A.C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7: 249–260.
- Carvalho, D.D.C., Mello, S.C.M. D., Lobo Júnior, M. & Geraldine, A.M. 2011. Biocontrol of seed pathogens and growth promotion of common bean seedlings by *Trichoderma harzianum*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 46: 822–828.
- Devi, T.P., Kulanthaivel S., Kamil, D., Borah, J. L., Prabhakaran, N. & Srinivasa, N. 2013. Biosynthesis of silver nanoparticles from *Trichoderma* species. *Indian Journal of Experimental Biology*, 51: 543–547.
- Guilger, M., Pasquoto-Stigliani, T., Bilesky-Jose, N. Grillo, R., Abhilash, P. C., Fernandes Fraceto, L. & de Lima, R. 2017. Biogenic silver nanoparticles based on *Trichoderma harzianum*: synthesis, characterization, toxicity evaluation and biological activity. *Nature Scientific Reports*, 7:44421, DOI: 10.1038/srep44421.
- Gupta, B.P., Shrivastava, V. & Mathur, A. 2017. Study of the antimicrobial activity of *Trichoderma*-silver fused nanoparticles (TR-Ag Np0) against pathogenic bacterial and fungal strains. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 7: 146–154.

نتایج آزمون اثبات بیماری‌زایی نشان داد که هر دو جدایه‌ی قارچ *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* از این استان، بدون داشتن اختلاف معنی‌دار در قدرت بیماری‌زایی، می‌توانند در سه نوع لوبیا ایجاد بیماری کنند و شدت بیماری در لوبیا چشم‌بلبلی کمتر از لوبیاهای قرمز و چیتی بود، که نشان‌دهنده حساسیت کمتر آن به بیماری است. همچنین نتیجه این پژوهش نشان داد، که می‌توان از عصاره میسلیم جدایه‌های ایرانی کارآمد قارچ *T. harzianum* ماده نانوذره نقره‌ای تولید کرد، که شدت این بیماری خاک‌زاد را به نحو معنی‌داری کاهش دهد. تاثیر بیشتر ماده نانوی تولیدی در کاهش شدت بیماری از عصاره خالص *T. harzianum* و محلول نیترات نقره نشان می‌دهد، که با تشکیل ذرات نانو خاصیت قارچ‌کشی این ماده نسبت به مواد اولیه آن افزایش یافته است. رنگ مخلوط حاوی عصاره قارچ و یون‌های نقره پس از ۲۴ ساعت، از زرد کم

- Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I. & Monte, E. 2012. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* sp. and its genes. *Microbiology*, 158: 17–25.
- John, R.P., Tyagi, R., Prévost, D., Brar, S.K., Pouleur, S. & Surampalli, R. 2010. Mycoparasitic *Trichoderma viride* as a biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *adzuki* and *Pythium arrhenomanes* and as a growth promoter of soybean. *Crop Protection*, 29: 1452–1459.
- Karimian, B., Javan-Nikkhah, M., Abbasi, M. & Ghazanfari, K. 2010. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* isolates from common bean and distribution of mating type alleles. *Iranian Journal of Biotechnology*, 8: 90-97.
- Khaghani, S., Bihamta, M.R., Hosseini, S.D., Mohammadi, S.A. & Darvish, F. 2012. Genetic analysis of common bean agronomic traits in stress and non-stress conditions. *African Journal of Agricultural Research*, 7: 892–901.
- Leslie, J.F. & Summerell, B.A. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK.
- Min, J.S., Kim, K.S., Kim, S.W., Jung, J.H., Lamsal, K., Kim, S. B., Jung, M.Y. & Lee, Y.S. 2009. Effects of colloidal silver nanoparticles on sclerotium-forming phytopathogenic fungi. *The Plant Pathology Journal*, 25: 376–380.
- Osuinde, M., Aluya, E. & Emoghene, A. 2002. Control of *Fusarium* wilt of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) by *Trichoderma* species. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 37: 47–55.
- Padmodaya, B. & Reddy, H.R. 1996. Screening of *Trichoderma* spp. against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* causing wilt in tomato. *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology*, 26: 266–270.
- Park, H.J., Kim, S.H., Kim, H.J. & Choi, S.H. 2006. A new composition of nanosized silica-silver for control of various plant diseases. *The Plant Pathology Journal*, 22: 295-302.
- Saremi, H., Amiri, M. & Ashrafi, J. 2011. Epidemiological aspects of bean decline disease caused by *Fusarium* species and evaluation of the bean resistant cultivars to disease in Northwest Iran. *African Journal of Biotechnology*, 10: 14954–14961.
- Schwartz, H.F., Steadman, J.R., Hall, R. & Forster, R.L. 2005. *Compendium of Bean Diseases*. American Phytopathological Society Press, MN, USA.
- Seabra, A.B. & Durán, N. 2015. Nanotoxicology of metal oxide nanoparticles. *Metals*, 5: 934–975.
- Shelar, G.B. & Chavan A.M. 2015. Myco-synthesis of silver-nanoparticles from *Trichoderma harzianum* and its impact on germination status of oil seed. *Biolife Journal* 3:109–113.
- Vahabi, K., Mansoori, G.A. & Karimi, S. 2011. Biosynthesis of silver nanoparticles by fungus *Trichoderma reesei* (a route for large-scale production of AgNPs). *Insciences Journal*, 1: 65–79.
- Zhang, X., Yan, S., Tyagi, R. & Surampalli, R. 2011. Synthesis of nanoparticles by microorganisms and their application in enhancing microbiological reaction rates. *Chemosphere*, 82: 489–494.

Biological control of bean Fusarium wilt by silver nanoparticle extract of *Trichoderma harzianum***Mahnaz Keshavarz, Mehdi Sadravi, Mohammad Abdollahi**

Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran

Corresponding author: Mehdi Sadravi, msadravi@yu.ac.ir

Received: 15, Sep., 2018

6(2) 57-66

Accepted: 2, Jul., 2019

Abstract

Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* is an important worldwide disease of beans. The pathogenicity of two isolates from the southwest of Iran was tested on cowpea, red bean, and kidney bean. To find the appropriate method for biological control of the disease, the inhibition of mycelial growth of fungal isolates by silver nanoparticle extract of *Trichoderma harzianum* was investigated *in vitro*. The extract of superior isolate of *T. harzianum* was converted into nanoparticles by mixing with silver-nitrate solution, and the formation of nanoparticles was proved by ultraviolet light spectroscopy. The maximum absorption was at 440 nm in a concentration of 5 Mm of silver-nitrate. The inhibitory effect of 10 concentrations of this nanoparticle on the mycelial growth of hyper-virulent isolate of the pathogen examined and the concentration of EC50 = 650 ppm was determined. The effect of EC30, EC50, EC70 concentrations of this synthesized nanoparticles solution, pure *T. harzianum* extract and silver-nitrate solution on the severity of the disease in kidney and red beans was tested in greenhouse conditions. All treatments significantly reduced the severity of the disease in beans, but their efficacy was lower than those of silver-nitrate and pure extract of *T. harzianum*. The biological control potential of Fusarium wilt by silver nanoparticle extract of *T. harzianum* is being reported for the first time.

Keywords: Plant disease, wilt, red bean, kidney bean, cowpea, nanoparticle
