

کاربرد نانوذره‌های نقره ساخته شده به کمک عصاره آبی پوست نارنج جهت کنترل

بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicon* L.)

Application of Synthesized Silver Nanoparticles via Aqueous Extract of Sour Orange Peel to Control *Fusarium* Wilt Disease of Tomato (*Solanum lycopersicon* L.)

محبوب لطفی، وحید زرین نیا*، مجتبی دلشاد، امیر موسوی و فرشته نعمت‌اللهی^۲

چکیده

بیماری پژمردگی آوندی گوجه‌فرنگی ناشی از قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* یکی از مهمترین بیماری‌های این محصول به‌شمار می‌آید. با توجه به خطرهای زیست محیطی که ناشی از مصرف بی‌رویه سموم شیمیایی است، استفاده از روش‌های غیرشیمیایی و طبیعی جهت کنترل عوامل بیماری‌زا، ضروری به نظر می‌رسد. لذا این پژوهش برای بررسی اثرهای ضد قارچی نانوذره‌های نقره سبز ساخت، در شرایط درون شیشه‌ای (*in vitro*) و برون شیشه‌ای (*in vivo*) روی قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* به صورت فاکتوریل، در قالب طرح کامل تصادفی و در سه تکرار انجام شد. تیمارها در شرایط درون شیشه‌ای (*in vitro*) شامل شاهد (آب مقطر)، سوسپانسیون نانوذره‌های نقره و عصاره پوست نارنج در غلظت‌های ۲۵، ۷۵، ۱۰۰ و ۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر در نظر گرفت شد و تاثیر آن‌ها بر میزان بازدارندگی از رشد سویه‌های F1 و F16 این قارچ ارزیابی شد. سپس، تاثیر موثرترین تیمار (سوسپانسیون نانوذره‌های نقره بهینه شده در شرایط تاریکی و نور) در چهار سطح ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر و تیمار سوسپانسیون قارچ در دو مرحله پیش‌تیمار و پس‌تیمار بر ویژگی‌های ریخت‌شناسی گیاه گوجه‌فرنگی و شدت و شیوع بیماری پژمردگی آوندی فوزاریومی بررسی شد. نتیجه‌های آزمایشگاهی نشان داد نانوذره‌های نقره در شرایط تاریکی در غلظت ۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر بهترین تأثیر را در بازدارندگی رشد سویه‌ها داشتند. در پژوهش‌های گلخانه‌ای، تیمار نانوذره‌های نقره توانست شدت و شیوع بیماری را کاهش دهد، اما در بین غلظت‌های مختلف نانوذره‌های نقره در شرایط تاریکی، غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر به واسطه اثرهای سمی خود، بیشترین تأثیر را در کاهش عملکرد گوجه‌فرنگی به همراه داشت. واژه‌های کلیدی: شدت و شیوع بیماری، گوجه‌فرنگی، نانوذره‌های سبز نقره، اثرات ضد میکروبی، فوزاریوم.

مقدمه

مدیریت بیماری‌های قارچی در محصولات غذایی از نظر اقتصادی مهم است. فوزاریوم یکی از عوامل بیماری‌زای مهمی است که رشد و عملکرد بسیاری از گیاهان را زیر تأثیر خود قرار می‌دهد. این قارچ گاهی به صورت اندوفیت^۱ و بدون بروز نشانه‌ها و در شرایط متنوع رشد می‌کند. گونه‌های جنس *Fusarium* spp. انواع

۱- تاریخ دریافت: ۹۷/۲/۳

تاریخ پذیرش: ۹۷/۹/۱۹

۲- به ترتیب دانشجوی دکتری علوم باغبانی، گروه علوم باغبانی و زراعت، استادیار گروه گیاه‌پزشکی واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی تهران، دانشیار گروه علوم باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، دانشیار پژوهشگاه ملی ژنتیک و زیست فناوری، تهران و استادیار گروه شیمی، واحد شرق، دانشگاه آزاد اسلامی تهران، ایران.

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: (zarrinnia@srbiau.ac.ir)

از بیماری‌ها با شدت‌های مختلف از جمله پوسیدگی ریشه و ساقه، شانکر، پژمردگی‌های ساقه و ریشه، پوسیدگی میوه و بذر و بیماری‌های برگ را ایجاد می‌کنند. همواره از روش‌های مختلفی برای مقابله با این بیماری‌ها استفاده شده است. تناوب زراعی، کنترل شرایط خاک از نظر رطوبت و زهکشی و pH، استفاده از بذر عاری از بیماری و اجتناب از کاشت بذرهای تولید شده از گیاهان آلوده به قارچ فوزاریوم، استفاده از کودهای نیترا ته به جای کودهای آمونیومی، ریشه کنی و از بین بردن بافت‌ها و بقایای گیاهی آلوده در آخر فصل، استفاده از قارچ کش‌های سیستمیک از جمله روش‌هایی هستند که برای کنترل این بیماری استفاده می‌گردند (۷).

به‌تازگی پژوهشگران به دلیل ناکارآمدی روش‌های معمول در حوزه کنترل بیماری‌های قارچی گیاهان به دنبال روش‌هایی پاک، غیر سمی، مقرون به صرفه و سازگار با محیط زیست و در عین حال با بازدهی بالا هستند و روی قارچ‌کش‌های صنعتی با ساختار نانویی متمرکز شده‌اند. با استفاده از عصاره گیاهان در حضور نمک‌های فلزی مانند نیترات نقره می‌توان نانوذره‌های فلزی ساخت و اثرهای میکروبی‌کشی این فلزها را چندین برابر نمود. گروه‌های فعال شیمیایی مانند فلاونوئید و فنول‌های موجود در عصاره آبی پوست نارنج یکی از ترکیب‌های مؤثر در ساخت سبز بوده (۲۰) و عامل احیا نیترات نقره می‌باشد.

یکی از کاربردهای بالقوه نقره، کنترل بیماری‌های گیاهی است. نقره حالت‌های چند گانه‌ای از فعالیت بازدارنده در مقابل ریزجانداران را نشان می‌دهد. بنابراین، ممکن است با ایمنی نسبی برای کنترل انواع بیماری‌زاهای گیاهی استفاده شود (۱۱). نتیجه‌های پژوهش‌های دانشمندان نشان می‌دهد که نقره به طیف گسترده‌ای از فرآیندهای زیست‌شناسی در ریزجانداران از جمله ساختار غشا یاخته‌ای و عملکرد آن حمله می‌کند (۱۷). همچنین نقره این توانایی را دارد که بیان پروتئین‌های مرتبط با تولید ATP را متوقف کند. مشاهده شده است که یون‌های نقره نمونه‌هایی از اکسیژن فعال (ROS) تولید می‌کنند که باعث آسیب به یاخته‌ها، پروتئین‌ها، چربی‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌شود (۲۱). پژوهشگران نشان داده‌اند که یون نقره از راه تولید گونه‌های فعال اکسیژن، بر فسفولیپیدها اثر گذاشته و باعث پراکسیداسیون آن‌ها شده و غشا یاخته‌ای ریزجانداران را تخریب می‌کند. از این گذشته نقره ممکن است جانشین سولفور در گروه‌های SH- غشا یاخته‌ای ریزجانداران گردد و آن‌ها را تخریب کند (۵).

پژوهش‌ها نشان داده که نانوذره‌های فلزی، باقی مانده سم کم‌تر در طبیعت و طیف گسترده‌ای از فعالیت ضد میکروبی برخوردارند. همچنین برای کاهش بیماری‌های گیاهی ایجاد شده به وسیله هاگ‌های تولید شده توسط قارچ‌های بیماری‌زا مؤثر می‌باشند. فناوری نانو علمی است که به شناسایی، تولید و استفاده از مواد در مقیاس نانومتر (۱۰^{-۹} متر) می‌پردازد. این فناوری که قدرت سازماندهی را در حد مولکولی فراهم ساخته در بیماری‌شناسی گیاهی برای تشخیص بیمارگرها، مبارزه با قارچ‌ها و باکتری‌ها، تهیه سم‌های شیمیایی و برای تولید نانو حسگرهای زیستی کاربرد دارد. فعالیت ضد میکروبی نانو ذره‌ها تابعی از سطح تماس با ریزجانداران می‌باشد. اندازه کوچک و نسبت سطح به حجم بالا، طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های ضد میکروبی احتمالی را افزایش می‌دهد (۱۲). استفاده از یون نقره به صورت ذره‌های نانو به علت داشتن سطح تماس بیشتری در فضای بیرونی و اندازه کوچک آن‌ها منجر به افزایش مقدار چسبندگی به سطح یاخته و افزایش کارایی و سمیت آن‌ها شده که در نهایت تخریب دیواره یاخته‌ای و برهم زدن سازوکار رشد عامل بیماری‌زا را به دنبال دارد (۱۹). کاربرد نانوذره‌های نقره می‌تواند رشد قارچ‌ها و عوامل بیماری‌زای گیاهی را به تأخیر بیاورد (۱۴). از سوی دیگر، ویژگی نانوذره‌های نقره از نظر شکل و اندازه باعث شده است که این نانوذره‌ها بتوانند با تخریب غشا فعالیت ضد میکروبی بالایی از خود نشان دهند (۱۶). نانوذره‌ها با اتصال به سطح یاخته ابتدا دیواره را سوراخ و سپس با ورود به داخل یاخته باکتری یا قارچ و ایجاد تداخل در مسیرهای مختلف متابولیکی و تولید مثل، در نهایت منجر به مرگ آن‌ها می‌شوند (۱۵). پژوهش

حاضر با هدف بررسی اثرات ضد قارچی نانوذره‌های نقره ساخته شده به روش سبز به منظور کنترل بیماری پژمردگی آوندی فوزاریومی به عنوان یکی از مهمترین بیماری های گوجه‌فرنگی انجام شده است.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در پاییز و زمستان سال ۱۳۹۵ و بهار و تابستان سال ۱۳۹۶ در آزمایشگاه شیمی آلی و باغبانی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران و کلینیک گل و گیاه اداره فضای سبز شهرداری منطقه ۲۲ تهران به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کامل تصادفی و در سه تکرار روی گیاه گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicon L.*) رقم سوپر چف (Super chef) (حساس به قارچ فوزاریوم) اجرا شد.

به منظور تهیه نانوذره‌های سبز نقره، میوه نارنج خریداری شد. پوست نارنج با آب مقطر شستشو و در سایه خشک گردید و سپس با آسیاب پودر شد. پنج گرم از پودر توزین و با ۱۰۰ میلی لیتر آب دوبار تقطیر در دمای ۸۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه داخل حمام آب گرم قرار گرفت، سپس عصاره به دست آمده صاف گردید (سانتریفیوژ مدل Eppendorf- ساخت ایتالیا) و روشنین آن جهت آزمون‌های بعدی در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد. عصاره به دست آمده خشک گردید و توسط آزمون‌های فیتوشیمیایی (معرف‌های شیمیایی برای تشخیص ترکیب‌های آلی موجود در نمونه) مورد بررسی قرار گرفت.

عصاره در حضور معرف‌های منیزیم به همراه کلرید هیدروژن تولید رنگ ارغوانی و در حضور سرب و استات تولید رنگ زرد کرد و به این ترتیب ترکیب فلاونوئید شناسایی گردید (تست Shinoda). ترکیب فلاونوئید در عصاره سبب تشکیل نانوذره‌های نقره از نمک نیترات نقره خواهد شد.

به منظور ساخت نانوذرات نقره سبز از محلول نیترات نقره استفاده شد. محلول نیترات نقره از نمک نیترات نقره با ۹۸ درصد خلوص ساخته شده و برای این آزمایش در غلظت‌های ۰.۱، ۰.۵ و ۱ میلی مولار آماده شد (شرکت Merck آلمان). محلول‌های نیترات نقره تحت شرایط تاریکی به عصاره، به ترتیب با نسبت درصد حجمی (۱:۹۹) (۴:۹۶) و (۷:۹۳) اضافه گردید (شرایط تاریکی). مخلوط عصاره و نیترات نقره سپس در کاغذ فویل پوشانیده و در انکوباتور (مدل IKA) در دمای اتاق نگهداری گردید. پس از گذشت ۸ ساعت رنگ محلول از بی‌رنگ به قهوه‌ای تغییر کرد. روند مشابه آماده سازی ساخت نانوذره نقره در شرایط تابش نور (۲۰ دقیقه در معرض تابش نور آفتاب) انجام گرفت (شرایط روشنایی). در تمام طول روند ساخت نانوذرات نقره دمای اتاق و pH ثابت نظر گرفته شد. اولین نشانه تولید و ساخت نانو ذرات نقره، تغییر رنگ محلول از بی رنگ به سمت قهوه‌ای شدن می‌باشد. (۲۲). نانوذره‌های نقره تولید شده توسط آزمون‌های تغییر رنگ و روش اسپکتروفوتومتری نور مرئی (طول موج ۳۵۰ تا ۷۰۰ نانومتر) شناسایی گردید. برای تعیین غلظت، اندازه و ماهیت نانوذره‌های تهیه شده از آزمایش‌های مختلفی استفاده شد. از روش طیف‌بینی فرسرخ برای بررسی ویژگی‌های طیفی نانوذره‌ها، از آزمون پراش اشعه ایکس با استفاده از دستگاه XRD (مدل Seifert XRD 3003 PD- (Germany) برای تعیین ترکیب و ماهیت نانوذره‌ها و از میکروسکوپ الکترونی عبوری (SEM) (مدل Philips EM 208) برای تعیین اندازه و شکل نانوذره‌های تولید شده و از دستگاه جذب اتمی^۵ به منظور تعیین غلظت نانوذره‌های نقره زیست‌ساخت شده استفاده گردید.

تیمارهای مورد بررسی در این تحقیق شامل غلظت‌های ۲۵، ۷۵، ۱۰۰ و ۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر از سوسپانسیون نانوذره نقره بهینه شده (در شرایط نور و تاریکی) و عصاره پوست نارنج (به منظور ارزیابی تاثیر عصاره به تنهایی روی ویژگی‌های مورد مطالعه) بود. به منظور ارزیابی تاثیر تیمارهای مورد مطالعه یک دوره زمانی ۳ روزه نیز هم‌چنین، از آب مقطر به عنوان تیمار شاهد استفاده شد. پژوهش حاضر در دو مرحله صورت گرفت. در مرحله اول، اثر عصاره آبی نارنج و تیمار نانوذره‌های نقره در شرایط تاریکی و روشنایی بر مقدار بازدارندگی رشد سویه‌های

F1 و F16 قارچ، *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله دوم، بر اساس نتیجه‌های به‌دست آمده از مرحله اول آزمایش، اثر تیمار نانوذره‌های نقره در شرایط تاریکی در چهار سطح ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر در دو وضعیت پیش تیمار و پس تیمار بر ویژگی‌های ریخت‌شناسی گیاه گوجه‌فرنگی مانند وزن تر و خشک گیاه، ارتفاع ساقه، طول ریشه و همچنین بر شدت و شیوع بیماری فوزاریوم بررسی شد. در این آزمایش از نشانه‌های اختصاری E، D و L به‌ترتیب برای عصاره آبی پوست نارنج، نانوذره نقره در شرایط نور و نانوذره نقره در شرایط تاریکی استفاده شد.

پس از ساخت و بهینه‌سازی شرایط تولید، از سوسپانسیون نانوذره نقره در آزمون‌های ضد قارچی استفاده گردید. سویه‌های F1 و F16 قارچ *F.oxysporum* f.sp. *lycopersici* از کلکسیون قارچ‌شناسی مجتمع آزمایشگاهی زکریای رازی دانشگاه علوم و تحقیقات تهران تهیه شد. از محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار (PDA) (ساخت شرکت Merk آلمان به میزان ۳۹ گرم در لیتر) برای کشت جدایه‌های قارچی استفاده گردید. برای این منظور محیط کشت پس از ضد عفونی شدن با استفاده از اتوکلاو (دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس، فشار ۱/۵ اتمسفر برای ۱۵ دقیقه) داخل ظروف پتری با قطر ۸ سانتی‌متر ریخته شد. در نهایت در هر ظرف پتری یک قطعه به قطر ۵ میلی‌متر از حاشیه محیط کشت ۴ روزه سویه‌های F1 و F16 قارچ *F.oxysporum* f.sp. *lycopersici* کشت شد.

برای بررسی اثر نانوذره‌های نقره و عصاره آبی نارنج بر کنترل قارچ، در روز سوم از رشد قارچ، پس از آن‌که اندازه قارچ به اندازه یک سکه دو ریالی رسید ۲۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های ۲۵، ۷۵، ۱۰۰ و ۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر از سوسپانسیون نانوذره نقره بهینه شده (در شرایط نور و تاریکی) و عصاره پایه روی سطح قارچ رشد یافته ریخته شد به گونه‌ای که تمام سطح را احاطه نماید. تیمار آب مقطر به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. درصد بازدارندگی از رشد سویه‌های قارچ از طریق رابطه زیر محاسبه شد.

$$\text{درصد بازدارندگی رشد} = \frac{H - h}{H} \times 100$$

که در آن، H قطر رشد میسلیم قارچی در ظرف پتری شاهد و h قطر رشد میسلیم قارچی روی ظرف پتری تیمارها (غلظت‌های نانوذره‌های نقره و عصاره) بود (۱۱).

به منظور ارزیابی تاثیر نانو ذره‌های نقره بر گسترش بیماری پژمردگی آوندی در شرایط برون شیشه‌ای، بذره‌های گوجه‌فرنگی پس از تهیه، توسط محلول هیپوکلرید سدیم گندزایی و سپس با آب مقطر استریل آبشویی شدند. پس از آن درون سینی‌های مخصوص نشاء حاوی کوکوپیت در گلخانه با رطوبت ۷۰٪ و دمای 25 ± 2 درجه سلسیوس کشت گردیدند. پس از گذشت ۲۱ روز از تاریخ کاشت، نشاها از سینی کشت بیرون کشیده شده، قسمت انتهایی ریشه‌ها هرس و به مدت ۱۰ دقیقه در محلول نانوذره‌های نقره با غلظت‌های مشخص غوطه‌ور گردید. سپس، نشاها درون گلدان‌هایی با قطر ۱۵ سانتی‌متر و با بستر کوکوپیت کشت شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت ۵۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون قارچی با غلظت 4×10^6 اسپور در میلی‌لیتر در اطراف ریشه گیاه تزریق شد. در این مرحله نانوذره‌های نقره به عنوان پیش تیمار استفاده گردید و در آزمایش پس تیمار، نشاها از سینی کشت بیرون آورده شدند، ۲ سانتی‌متر از انتهای ریشه‌ها هرس و ۱۰ دقیقه در سوسپانسیون قارچ غوطه‌ور گردید و سپس در بستر کشت قرار گرفتند. پس از ۲۴ ساعت، ۵۰ میلی‌لیتر از نانوذره‌های نقره در غلظت‌های مختلف اطراف ریشه گیاه تزریق شد.

حدود ۳ هفته پس از تلقیح قارچ، ویژگی‌های رویشی گیاه و نشانه‌های شاخص بیماری براساس رتبه‌بندی احمد و همکاران (۳) محاسبه و ثبت گردید. طبق این رتبه‌بندی، برای گیاهان سالم عدد ۱، گیاهانی که برگ‌های پایینی آنها

زرد شده‌اند عدد ۲، گیاهانی که دچار پژمردگی شده‌اند عدد ۳، گیاهانی که دچار لکه‌های بزرگ و پژمردگی شدید شده‌اند عدد ۴ و گیاهان مرده و خشکیده عدد ۵ در نظر گرفته شد. شدت بیماری از رابطه زیر محاسبه گردید.

$$DS = (n_1 \times 1 + n_2 \times 2 + n_3 \times 3 + n_4 \times 4 + n_5 \times 5) / (n_5 + n_4 + n_3 + n_2 + n_1)$$

که در آن، n_1, n_2, n_3, n_4, n_5 : تعداد گیاهانی هستند که با شماره‌های مختلف، نشانه‌های بیماری را نشان دادند. شیوع بیماری^۲ نیز از رابطه زیر بررسی گردید.

$$DI = \frac{(\text{تعداد گیاهان بیمار در هر تیمار})}{(\text{کل بوته‌ها در هر تیمار})} \times 100$$

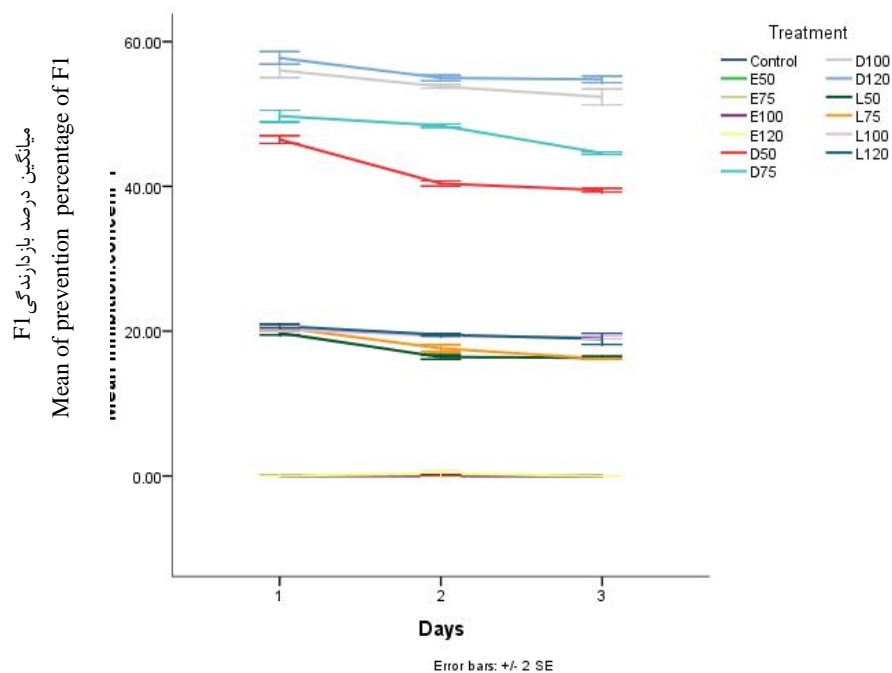
برای طراحی آزمایش و بهینه کردن شرایط عملیاتی سنتز نانوذره‌های نقره (تحلیل اطلاعات آزمایشی و ضرایب رگرسیونی)، ارزیابی‌های مربوط به آزمون‌های درون شیشه و درون زیوه از نرم افزار آماری SAS 9.1 و Design Expert و برای انجام مقایسه میانگین‌ها از آزمون LSD در سطح احتمال یک درصد (P 1%)^۲ استفاده گردید. رسم نمودارها نیز توسط نرم افزار Excel انجام شد.

نتایج و بحث

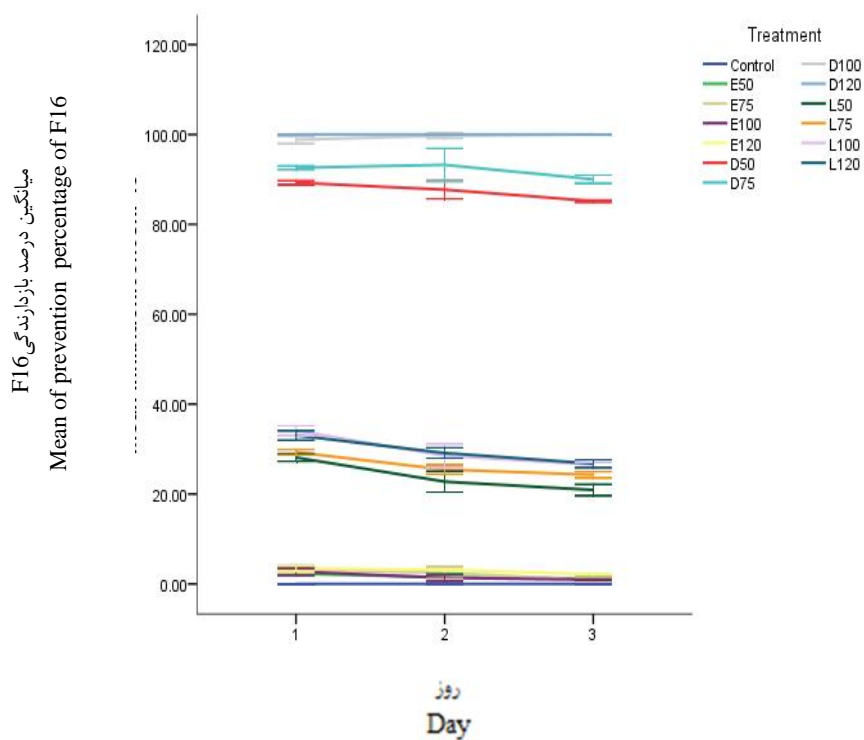
اثرات ضد میکروبی نانوذره‌های نقره بر سویه‌های F1 و F16 قارچ *F. oxysporum f.sp. lycopersici* در شرایط درون شیشه‌ای

نتیجه‌های تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد، اثر نانوذره‌های نقره، زمان و اثر متقابل نانوذره - زمان بر مقدار بازدارندگی از رشد سویه F1 قارچ *F. o. f.sp. lycopersici* در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود (جدول ۱). طبق نتیجه‌های مربوط به مقایسه میانگین در بین تیمارهای مختلف نانوذره‌ها، بیشترین و کمترین مقدار بازدارندگی از رشد سویه F1 با میانگین‌های ۵۵/۸ و ۰/۰۲٪ به ترتیب در تیمارهای D120 و E75 مشاهده شد (جدول ۲). در بین روزهای مورد بررسی، بیشترین و کمترین رشد سویه F1 به ترتیب متعلق به روزهای اول و سوم بود (جدول ۲). به‌طور کلی، رشد سویه F1 در روزهای دوم و سوم نسبت به روز اول به ترتیب ۷/۱۴ و ۱۰٪/۲ کاهش یافت. نتیجه‌های اثر برهمکنش عوامل آزمایشی نشان داد که بیشینه مقدار بازدارندگی از رشد سویه F1 با ۵۷/۷٪ در تیمار D120 و در روز اول مشاهده گردید. کمینه این مقدار نیز با میانگین‌های صفر تا ۰/۲۹٪ در تیمارهای شاهد، E50، E75، E100 و E120 در روزهای اول تا سوم به دست آمد (شکل ۱ قسمت A).

طبق نتیجه‌های مقایسه میانگین، در بین تیمارهای مختلف نانوذره‌های نقره، بیشینه مقدار بازدارندگی رشد سویه F16 با میانگین‌های ۱۰۰ و ۹۹/۵۰٪ به‌طور مشترک در تیمارهای D120 و D100 مشاهده شد. کمینه این مقدار نیز با ۱/۶۵٪ به تیمار E50 اختصاص یافت (جدول ۱). در بین روزهای مورد بررسی، بیشترین و کمترین رشد سویه F16 به ترتیب در روزهای اول و سوم مشاهده شد (جدول ۱). به‌طور کلی، رشد سویه F16 در روزهای دوم و سوم نسبت به روز اول به ترتیب ۴/۲۸ و ۷/۳۰٪ کاهش یافت. نتیجه‌های اثر برهمکنش عوامل آزمایشی نشان داد که بیشینه مقدار رشد سویه F16 با مقدار ۱۰۰٪ در تیمار D120 و در روزهای اول تا سوم حاصل شد. کمینه این مقدار نیز با میانگین ۰/۸۴۶٪ در تیمار E75 و در روز سوم مشاهده گردید (شکل ۱ قسمت B).



A
الف



B
ب

Fig. 1. Inhibitory effects of different types and concentrations of silver nanoparticles on F1 (A) and F16 (B) strains of *F.o.f.sp.lycopersici* through three days after treatment.

شکل ۱- اثرهای بازدارندگی نوع و غلظت‌های مختلف نانوذره نقره بر سویه‌های (A) F1 و (B) F16 قارچ *F.o.f.sp.lycopersici* طی سه روز پس از تیمار.

جدول ۱- مقایسه میانگین اثرهای زمان، نوع و غلظت نانوذره‌های نقره بر بازدارندگی از رشد سویه‌های F1 و F16 قارچ *F.o.f.sp.lycopersici*

Table 1. Comparison means of time, concentration, and type effects of silver nano particles on growth inhibitory of F1 and F16 strains of *F.o.f.sp.lycopersici*.

عامل آزمایشی Treatment	سویه F1 Strain F1	سویه F16 Strain F16
نانوذره Nanoparticle (شاهد (آب مقطر) Control(distilled water)	0.00 ^h	0/00 ⁱ
E50	0.040 ^h	67.1 ^h
E75	0.025 ^h	17.2 ^{gh}
E100	0.034 ^h	69.1 ^h
E120	0.112 ^h	92.2 ^g
D50	42.10 ^d	30.78 ^c
D75	47.50 ^c	91.90 ^b
D100	54.00 ^b	99.50 ^a
D120	55/80 ^a	100 ^a
L50	17.40 ^g	23.90 ^f
L75	18.10 ^f	26.30 ^e
L100	19.60 ^e	29.70 ^d
L120	19.70 ^e	29.60 ^d
LSD	0.58	0.83
روز Day		
1	22.40 ^a	39.70 ^a
2	20.80 ^b	38.00 ^b
3	20.10 ^c	36.80 ^c
LSD	0.16	0.400

E: extract of bitter orange peel, D: silver nanoparticles at dark conditions, L: silver nanoparticles at light conditions. Means with at least one similar letters in each column are not significantly different (LSD 0.05).

E: عصاره پوست نارنج، D: نانوذره‌های نقره در شرایط تاریکی، L: نانوذره‌های نقره در شرایط نور. در هر ستون میانگین‌هایی که دستکم دارای یک حرف مشترک هستند، بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌دار ندارند.

عزیزیان و همکاران (۴) گزارش کردند، استفاده از نانوذره‌های نقره در غلظت‌های مختلف، اثرهای ضد میکروبی بسیار قوی‌تری نسبت به عصاره آبی گیاه آقطی^۱ و محلول نقره دارا بودند. ایشان همچنین گزارش کردند که میزان تاثیر بازدارندگی نانوذرات نقره نیز بر حسب نوع غلظت متفاوت است. در پژوهشی دیگر kim و همکاران (۱۱)،

گزارش کردند که استفاده از غلظت‌های ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذره‌های نقره در مقایسه با سایر تیمارها، تاثیر بیشتری در کنترل رشد سویه‌های قارچی بیماری‌زای گیاهی دارند. در حقیقت با افزایش غلظت نانوذره‌های نقره بر مقدار بازدارندگی افزوده شد. نانوذره‌های نقره منجر به کاهش قابلیت تکثیر رشته‌های DNA (۷)، غیرفعال شدن پروتئین‌های ریبوزومی و زیرمجموعه آن و نیز برخی دیگر از پروتئین‌های یاخته‌ای و آنزیم‌هایی که برای تولید ATP ضروری‌اند، می‌شوند (۲۱).

وزن تر و خشک

نتیجه اثر برهمکنش عوامل آزمایشی نشان داد که بیشینه وزن تر گوجه‌فرنگی با ۱۲/۹۰ گرم در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر از نانوذره‌های نقره در شرایط پیش تیمار و کمینه وزن با مقادیر ۷/۰۰ و ۷/۱۱ گرم به ترتیب در زمان پیش تیمار و پس تیمار در تیمار سوسپانسیون قارچ بدون اختلاف معنی‌دار مشاهده شد. همچنین، بیشینه وزن خشک با ۱/۱۹ گرم در زمان پیش تیمار ۵۰ میلی‌گرم در لیتر و کمینه آن با ۰/۶۳۷ گرم در زمان پیش تیمار سوسپانسیون قارچ مشاهده شد (جدول ۲). در پژوهشی دیگر McDonnell و Russell (۱۳) گزارش نمودند که اثرهای اولیه نانوذره‌های نقره روی عملکرد آنزیم‌های مهار غشایی (به‌ویژه آنزیم‌هایی که در زنجیره تنفسی نقش دارند) است که سبب تخریب یکپارچگی غشا یاخته‌ای می‌شود.

ارتفاع ساقه

بر اساس نتیجه‌های حاصل از مقایسه میانگین، بیشترین و کمترین ارتفاع ساقه با میانگین‌های ۲۲/۶ و ۱۱/۰ گرم به ترتیب به زمان‌های پیش تیمار و پس تیمار اختصاص یافت (جدول ۲). به گونه‌ای که ارتفاع ساقه گوجه‌فرنگی در زمان پیش تیمار نسبت به زمان پس تیمار ۵۱/۳٪ کاهش یافت. همچنین، در بین غلظت‌های مختلف نانوذره بیشینه و کمینه ارتفاع ساقه با ۱۹/۸۰ و ۱۲/۳۰ سانتی‌متر به ترتیب متعلق به تیمار ۵۰ میلی‌گرم در لیتر و سوسپانسیون قارچ بود (جدول ۲). به‌طور کلی، ارتفاع ساقه در گیاهان مورد بررسی زیر تأثیر تیمارهای ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر و سوسپانسیون قارچ نسبت به تیمار شاهد به ترتیب ۹/۰۱، ۱۱/۲، ۲۸/۶، ۳۸/۰ و ۴۲/۲٪ کاهش یافت. نتیجه‌های اثر برهمکنش عوامل آزمایشی نشان داد که بیشینه ارتفاع ساقه گوجه‌فرنگی با ۲۷/۸ سانتی‌متر در زمان پیش تیمار ۵۰ میلی‌گرم در لیتر و کمینه آن با ۹/۱۵ سانتی‌متر در زمان پس تیمار سوسپانسیون قارچ بود. احسان‌پور و نجاتی (۱) نیز مشاهده کردند که گیاهچه‌های رشد کرده در محیط‌های دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر نانوذره‌های نقره، از نظر برخی شاخص‌های ظاهری و به‌طور کیفی به مراتب رشد بهتر و مطلوب‌تری را نسبت به تیمار شاهد نشان دادند؛ اما غلظت‌های ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر نانوذره‌های نقره باعث کاهش برخی از شاخص‌های رشد مانند طول ساقه و فاصله میان‌گره‌های گیاهچه‌های سیب‌زمینی شدند.

طول ریشه

بر اساس نتیجه‌های مقایسه میانگین، در بین تیمارهای زمان، بیشترین و کمترین طول ریشه گوجه‌فرنگی با میانگین‌های ۱۰/۳۰ و ۶/۰۲ سانتی‌متر به ترتیب در زمان‌های پیش تیمار و پس تیمار مشاهده شد (جدول ۲). طول ریشه در زمان پیش تیمار نسبت به زمان پس تیمار ۴۱/۵۰٪ کاهش یافت. همچنین، در بین غلظت‌های مختلف نانوذره نقره بیشینه و کمینه طول ریشه با ۹/۳۲ و ۵/۸۸ سانتی‌متر به ترتیب متعلق به تیمار ۵۰ میلی‌گرم در لیتر و سوسپانسیون قارچ بود (جدول ۲). به‌طور کلی، طول ریشه در گیاهان مورد بررسی در تیمارهای ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر و سوسپانسیون قارچ نسبت به تیمار شاهد به ترتیب ۹/۵۱، ۱۲/۸۰، ۲۴/۷۰، ۳۴/۱۰ و ۴۲/۹۰٪ کاهش یافت. کرمی‌مهران و همکاران (۲) در مطالعه خود مشاهده کردند که استفاده از نانوذره‌های نقره در غلظت‌های بالا منجر به کاهش مقدار زیست توده گیاه، رشد ریشه، رشد اندام هوایی و تعداد برگ‌ها در مقایسه با تیمار شاهد شد. این پژوهشگران، علت آن را اثرهای سمیت نانوذره‌های نقره به دلیل اندازه کوچک و قدرت نفوذ بالا در گیاه

گوجه‌فرنگی دانستند. در پژوهش دیگر Velusamy . Gopinath (۷) نیز کاهش رشد گیاه در غلظت‌های بالای نانوذره‌های نقره را به ایجاد سمیت در این شرایط نسبت داده‌اند.

شدت و شیوع بیماری

بر اساس نتیجه‌های مقایسه میانگین در بین تیمارهای زمان، بیشترین و کمترین شدت علائم پژمردگی آوندی با میانگین‌های ۱۹/۶۰ و ۱۹/۰۰٪ و بیشترین و کمترین شیوع بیماری با میانگین‌های ۵۷/۴۰ و ۴۳/۷۰ به ترتیب به زمان‌های پس تیمار و پیش تیمار تعلق یافت (جدول ۲). شدت و شیوع بیماری پژمردگی آوندی نیز در زمان پس تیمار نسبت به پیش تیمار به ترتیب ۳/۰۶ و ۲۳/۷٪ افزایش یافت. همچنین، در بین غلظت‌های مختلف نانوذره، بیشینه و کمینه شدت بیماری با ۱۰۰ و ۳/۱۲٪ و بیشینه و کمینه شیوع بیماری با ۹۳/۳۰ و ۳۱/۱۰ درصد به ترتیب متعلق به تیمار سوسپانسیون قارچ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر نانو ذره نقره بود. اثر متقابل زمان و غلظت نانوذره بر این دو ویژگی در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار بود (جدول ۲ و ۳). این نتیجه‌ها با یافته‌های Jo و همکاران (۱۰) مطابقت دارد. این پژوهشگران در پژوهش‌های خود مشاهده کردند که استفاده از یون‌های نانوذره‌های نقره به صورت پیش تیمار به طور مؤثری بیماری‌های قارچی را کاهش می‌دهد. به طوری که کاربرد نانوذره‌های نقره ۳ ساعت قبل از تلقیح اسپور، سبب کاهش قابل توجه رشد عامل بیماری‌زای گیاهی خواهد شد، در حالی که استفاده از نانوذره‌های نقره در ۲۴ ساعت بعد از تلقیح تأثیر چشم‌گیری روی کنترل بیماری نداشته است. در پژوهشی دیگر احمد و همکاران (۳) نانوذره‌های نیکل را در شرایط آزمایشگاهی به منظور کنترل قارچ فوزاریوم در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر به کار بردند. نتیجه‌های پژوهش آن‌ها نشان داد که رشد قارچ، اسپورزایی و توان بیماری‌زایی قارچ‌های *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* F. و *oxysporum* f.sp. *lactucae* به مقدار ۶۰/۲ و ۵۹/۷٪ کاهش یافت. همچنین در شرایط گلخانه‌ای، کاربرد نانو ذره‌های نیکل در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر سبب کاهش ۵۸/۴ و ۵۷/۰ درصدی شدت بیماری به ترتیب در کاهو و گوجه‌فرنگی شد. همچنین کاربرد نانوذره‌های نیکل در غلظت بالا (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) به واسطه اثر سمیت آن منجر به کاهش پارامترهای رشدی در گیاهان گوجه‌فرنگی و کاهو شد، اما در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر رشد گیاه بهبود یافت (۳). در پژوهشی Bali Harris (۸) گزارش کردند که مقدار جذب نانوذره‌ها به طور مستقیم وابسته به غلظت مورد استفاده از آن‌ها و مدت زمان قرارگیری در برابر این ذره‌ها است. به طور کلی، شدت بیماری در گیاهان مورد بررسی زیر تأثیر تیمارهای ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و سوسپانسیون قارچ نسبت به تیمار شاهد به ترتیب ۳/۱۲، ۳/۷۶، ۴/۵۳، ۷/۷۸ و ۱۰۰٪ و شیوع بیماری به ترتیب ۳/۳۱، ۳/۴۳، ۲/۶۱، ۷۴/۵ و ۹۳/۳٪ کاهش یافت. نتیجه‌های اثر برهمکنش عوامل آزمایشی نشان داد که بیشینه شدت بیماری (۱۰۰٪) به طور مشترک در زمان‌های پیش تیمار و پس تیمار سوسپانسیون قارچ حاصل شد و کمینه آن با ۲/۲۳٪ در زمان پیش تیمار ۵۰ میلی‌گرم بود.

جدول ۲- مقایسه میانگین وزن تر، وزن خشک، طول ساقه، طول ریشه، شدت و شیوع بیماری پژمردگی آوندی گوجه‌فرنگی با کاربرد غلظت‌های مختلف نانوذره نقره در شرایط تاریکی در دو حالت پیش تیمار و پس تیمار.

Table 2. Comparison means of fresh weight, dry weight, shoot length, root length, disease severity, and disease incidence of tomato wilting disease by application of different concentrations of silver nanoparticles in both pre-treatment and post-treatments under dark conditions.

عامل آزمایشی Treatment	وزن تر Fresh weight (g)	وزن خشک Dry weight (g)	طول ساقه Shoot length (cm)	طول ریشه Root length (cm)	شدت بیماری Disease severity (%)	شیوع بیماری Disease incidence (%)
پیش تیمار Pre- treatment	10.6 ^a	0.988 ^a	22.6 ^a	10.3 ^a	19.0 ^b	43.7 ^b
پس تیمار Post- treatment	8/35 ^b	0.848 ^b	11.0 ^b	6.02 ^b	19.6 ^a	57.4 ^a
LSD	0/106	0.0077	0.306	0.175	0.07	3.75
شاهد (آب) مقطر) Control	11.4 ^a	1.07 ^a	21.3 ^a	10.3 ^a	0.00 ^f	0.00 ^f
50	11.0 ^b	1.047 ^b	19.8 ^b	9.32 ^b	3.12 ^e	31.30 ^e
100	10.6 ^c	1.01 ^c	18.9 ^c	8.98 ^c	3.76 ^d	43.30 ^d
200	8.93 ^d	0.877 ^d	15.20 ^d	7.75 ^d	4.53 ^c	61.20 ^c
300	7.82 ^e	0.788 ^e	13.20 ^e	6.78 ^e	4.78 ^b	74.50 ^b
سوسپانسیون قارچ Fungi Suspension	7.05 ^f	0.710 ^f	12.30 ^f	5.88 ^f	100 ^a	93.30 ^a
LSD	0.185	0.013	0.530	0.303	0.122	6.50

Means with at least one similar letters in each column are not significantly different (LSD = 0.05).

در هر ستون و برای هر عامل آزمایشی، میانگین‌هایی که دستکم دارای یک حرف مشترک هستند، بر اساس آزمون حداقل تفاوت معنی‌داری (LSD) در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌دار ندارند.

جدول ۳- مقایسه میانگین‌های اثر تیمار نانوذرات نقره (ساخته شده در شرایط تاریکی) در دو حالت پیش تیمار و پس تیمار بر وزن تر، وزن خشک، طول ساقه، طول ریشه، شدت و شیوع بیماری پژمردگی آوندی گوجه‌فرنگی

Table 3. Comparison means of pre and post-treatments effects of silver nanoparticles (making under dark condition) on fresh weight, dry weight, shoot length, root length, disease incidence and disease severity of tomato wilting disease

عامل آزمایشی Treatments	وزن تر Fresh weight (g)	وزن خشک Dry weight (g)	طول ساقه Shoot length (cm)	طول ریشه Root length (cm)	شدت بیماری Disease severity (%)	شیوع بیماری Disease incidence (%)
شاهد (آب) مقطر Control	13.8 ^a	1.24 ^a	30.5 ^a	13.5 ^a	0.00 ^h	0.00 ^g
پیش تیمار Pre-treatment						
50	12.9 ^b	1.19 ^b	27.8 ^b	11.99 ^b	2.23 ^g	22.2 ^f
100	12.6 ^c	1.17 ^c	26.0 ^c	11.4 ^c	3.10 ^f	31.1 ^{ef}
200	9.58 ^d	0.914 ^d	19.3 ^d	9.6 ^d	4.39 ^d	53.5 ^d
300	7.75 ^h	0.766 ⁱ	16.2 ^e	8.33 ^e	4.73 ^{bc}	66.8 ^c
سوسپانسیون قارچ Fungal spore Suspension						
شاهد (آب) مقطر Control	7.00 ⁱ	0.637 ^j	15.5 ^f	7.11 ^{fg}	100 ^a	88.8 ^{ab}
پس تیمار Post-treatment						
50	9.05 ^e	0.909 ^d	12.1 ^g	7.21 ^f	0.00 ^h	0.00 ^g
100	9.14 ^e	0.885 ^e	11.9 ^g	6.68 ^{gh}	4.02 ^e	39.9 ^e
200	8.67 ^f	0.862 ^f	11.8 ^g	6.54 ^h	4.41 ^d	55.5 ^d
300	8.27 ^g	0.840 ^g	11.0 ^h	5.83 ⁱ	4.66 ^c	68.8 ^c
سوسپانسیون قارچ Fungal spore Suspension						
300	7.88 ^h	0.811 ^h	10.1 ⁱ	5.23 ^j	4.84 ^b	82.2 ^b
	7.11 ⁱ	0.784 ⁱ	9.15 ^j	4.65 ^k	100 ^a	97.7 ^a
LSD	0.261	0.018	0.749	4.29	0.172	9.19

Means with at least one similar letters in each column are not significantly different (LSD = 0.05).

در هر ستون و برای هر عامل آزمایشی، میانگین‌هایی که دستکم دارای یک حرف مشترک هستند، بر اساس آزمون حداقل تفاوت معنی‌داری (LSD) در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌دار ندارند.

نتیجه گیری

بر اساس نتیجه‌های به دست آمده از پژوهش‌های آزمایشگاهی در بین تیمارهای مورد بررسی، کاربرد نانوذره نقره در شرایط تاریکی بیشترین تأثیر را در کنترل و بازدارندگی رشد سویه‌های F1 و F16 قارچ *lycopersici* *F. o. f. sp.* داشت. افزون بر آن، اثر غلظت تیمارهای مورد بررسی بر بازدارندگی رشد قارچ بسیار مشهود بود، به گونه‌ای که به تقریب با افزایش مقدار غلظت در همه تیمارهای مورد بررسی، بر مقدار کارایی آن‌ها برای جلوگیری از رشد سویه‌های F1 و F16 قارچ فوزاریوم به مقدار قابل توجهی افزوده شد. در پژوهش‌های گلخانه‌ای، مشاهده شد که گیاه گوجه‌فرنگی بهترین رشد و عملکرد را در شرایط شاهد و کمترین عملکرد را در تیمار سوسپانسیون قارچ به همراه داشت. در شرایط گلخانه‌ای، در شرایط کلی، کاربرد نانوذره‌های نقره در غلظت‌های مختلف نه تنها تأثیری در افزایش رشد گیاه نداشت، بلکه با افزایش مقدار غلظت آن موجب کاهش مقدار رشد نیز شد. به گونه‌ای که اثرهای منفی نانوذره‌های نقره روی گوجه‌فرنگی همزمان با افزایش مقدار غلظت آن به شدت افزایش یافت. بیشترین کاهش در ویژگی‌هایی همچون وزن تر و خشک، ارتفاع ساقه و طول ریشه پس از تیمار سوسپانسیون قارچ به غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر از تیمار نانوذره نقره در شرایط تاریکی اختصاص یافت. هم‌چنین در این پژوهش مشاهده شد که زمان کاربرد نانوذره‌های نقره می‌تواند در نتیجه‌های آزمایش تأثیرگذار باشد. به گونه‌ای که درصد و شدت بیماری در شرایط کاربرد نانوذره‌های نقره به صورت پیش تیمار نسبت به شرایط پس تیمار کاهش بیشتری را نشان داد و به همین دلیل زیر شرایط پس تیمار، عملکرد گیاه گوجه‌فرنگی کاهش بیشتری نشان داد. به عبارت دیگر، ویژگی‌های ریخت‌شناسی گوجه‌فرنگی در شرایط کاربرد نانوذره‌های نقره به صورت پیش تیمار از عملکرد بهتری برخوردار بودند و این مسئله نشان می‌دهد که اگر قبل از شروع فعالیت قارچ و تولید ریشه، گیاه در معرض نانوذره نقره قرار گیرد، کارایی نانوذره برای جلوگیری از افزایش شدت و شیوع بیماری فوزاریوم مؤثرتر خواهد بود که به دنبال آن زمینه را برای رشد و گسترش گیاه فراهم می‌آورد. با توجه به این‌که در این آزمایش از نانوذرات نقره به منظور کنترل بیماری پژمردگی فوزاریومی همراه با ارزیابی تأثیر آن بر صفات مورفولوژیک گیاه استفاده گردید و نتایج مطلوبی نیز حاصل شد. پیشنهاد می‌شود تا پژوهش‌های آینده با هدف تهیه و تولید فرمولاسیون‌های موثر از نانو ذرات نقره با قابلیت کاربرد در مزارع و درنهایت با هدف تجاری‌سازی برنامه ریزی گردد.

References

منابع

۱. احسانپور، ع. ا و ز. نجاتی. ۱۳۹۱. اثر نانو نقره بر مقدار کلروفیل، جیبرلیک اسید و الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های گیاه سیب زمینی رقم *White Desiree* در شرایط کشت در شیشه. مجله زیست‌شناسی کاربردی، ۲۵: ۱۳-۲۶.
۲. کرمی‌مهریان، س. س، ر. حیدری و ف. رحمانی. ۱۳۹۲. بررسی اثرات نانوذرات نقره روی خصوصیات فیزیولوژیکی و ریخت‌شناسی گیاه گوجه‌فرنگی. دومین همایش ملی مباحث نوین در کشاورزی. ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، ۲۴۴۲ ص. https://www.civilica.com/Paper-NCNCA02-NCNCA02_285.html
3. Ahmed, I., S. Ahmed, D.R. Yadav and Y.S. Lee. 2016. Applications of nickel nanoparticles for control of fusarium wilt on lettuce and tomato. International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology. 5:7378-7385.
4. Azizian Shermeh, O., J. Valizadeh, M. Noroozifar and A. Qasemi. 2016. Investigating the antimicrobial activities of silver nanoparticles biosynthesized by aqueous Extract of *Sambucus ebulus* L. sjimu. J. Ilam University. Medic. Sci. 24:92-108.

5. Dibrov, Pavel., J. Dzioba, K.K. Gosink and C.C. Häse. 2002. Chemiosmotic mechanism of antimicrobial activity of Ag⁺ in *Vibrio cholera*. Antim. Agents Chemother. 46:2668–2670.
6. Feng, Q.L., J. Wu, G.Q. Chen, F.Z. Cui, T.N. Kim and J.O. Kim. 2000. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. J. Biomed. Mater.Res. 52:662-8.
7. Gopinath, V. and P. Velusamy. 2013. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using *Bacillus sp. GP-23* and evaluation of their antifungal activity towards *Fusarium oxysporum*. Spectrochimica Acta Part A. Mol. Biomol. Spectrosc. 106:170–174.
8. Harris, A.T. and R. Bali. 2008. On the formation and extent of uptake of silver nanoparticles by live plants. J. Nanopart. Res.10:691-695.
9. Hediat, M. and H. Salama. 2012. Effects of silver nanoparticles in some crop plants, Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and corn (*Zea mays* L.). Int. Res. J. Biotech. 3:190-197.
10. Jo, Y.K., B.H. Kim and G. Jung. 2009. Antifungal activity of silver ions and nanoparticles on phytopathogenic fungi. Plant. Dis. 93:1037-1043.
11. Kim, S.W., J.H. Jung, K. Lamsal, Y.S. Kim, J.S. Min and Y.S. Lee. 2012. Antifungal effects of silver nanoparticles (AgNPs) against Various Plant Pathogenic Fungi. Mycobiol. 40:53–58.
12. Martinez-Gutierrez, F., P.L. Olive, A. Banuelos, E. Orrantia, N. Nino, E.M. Sanchez, F. Ruiz, H. Bach, Y. Av-Gay. 2010. Synthesis, characterization, and evaluation of antimicrobial and cytotoxic effect of silver and titanium nanoparticles. Nanomed. 6:681-8.
13. McDonnell, G., A.D. Russell. 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. Clin. Microbiol. Rev. 12:147-79.
14. Min, J.S. 2009. Effects of Colloidal Silver Nanoparticles on Sclerotium-Forming Phytopathogenic Fungi. Plant Pathol. J. 25:376-380.
15. Moadi, T., R. Ghahramanzadeh, M. Yosofi, F. Mohammadi. 2014. Synthesis of silver nanoparticles using four species plant and investigation of their antimicrobial activity. Iran. J. Chem. Eng. 4:1-9.
16. Morones, J.R., J.L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J.B. Kouri, J.T. Ramírez. 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. Nanotech. 16:23-46.
17. Pal S., Y.K. Tak. and J.M. Song. 2007. Does the Antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 73:1712–1720.
18. Seif Sahandi, M., A. Sorooshzadeh. H. Rezazadeh and H. A. Naghdibadi. 2011. Effect of nano silver and silver nitrate on seed yield of Borage. J. Medic. Plants. Res. 5:171-175.
19. Shah, V. and I. Belozeroва. 2009. Influence of metal nanoparticles on the soil microbial community and germination of lettuce seeds. Water. Air. Soil. Pollut. 97:143-148.

20. Suryawanshi, J.A.S. 2011. An overview of *Citrus aurantium* used in treatment of various diseases. Afr. J. Plant Sci. 7:390-5.
21. Yamanaka, M., K. Hara, J. Kudo. 2005. Bactericidal actions of a silver ion solution on *Escherichia coli*, studied by energyfiltering transmission electron microscopy and proteomic analysis. Appl. Environ. Microbiol. 71:7589-93.
22. Lotfi, M., M. Delshad, V. Zarinnia, A. Mousavi, and F. Nematollahi. 2018. Synthesis and optimization of plant-based silver nanoparticles and evaluation of antimicrobial properties J. Indian Chem. Soc. 95:1089-1096.

Application of Synthesized Silver Nanoparticles via Aqueous Extract of Sour Orange Peel to Control of Fusarium wilt disease in tomato (*Solanum lycopersicon* L.)

M. Lotfi, V. Zarinnia*, M. Delshad, A. Mousavi and F. Nematollahi¹

Wilting disease caused by *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* is one of the most important tomato diseases. Regarding to the destructive effects of overuse of chemical pesticides in the environment, applying of nonchemical compounds for plant disease control is unavoidable. Therefore the goal of this research was producing of green silver nanoparticles and understanding of their fungicide effects on F1 and F16 strains of *F.o.f.sp.lycopersici*. For this reason, fungicide effects of Ag NPs that were made under dark and lighting conditions, investigated by factorial method under CRD examination with three replications for each treatments. All experiments were done under *in vitro* and *in vivo* conditions. Treatments were distilled water as negative control, 25, 75, 100 and 120 mg L⁻¹ concentrations of Ag NPs suspension and aqueous sour orange extract. More effectively treatments regarding to their capability for highest inhibitory effects on fungal growth under *in vitro* condition were selected and used for *in vivo* experiments. These treatments were 50, 100, 200 and 300 mg L⁻¹ concentrations of Ag NPs (were made under dark and lightening conditions) that were applying as pre and post treatments on diseased tomato plants by *F.o.f.sp.lycopersici*. Morphological properties, disease incidence (DI) and disease severity (DS) were evaluated in this section. Finally the results of this research show that, 120 mg L⁻¹ concentration of Ag NPs (were made under dark condition) had the highest inhibitory effects on F1 and F16 strains of *F.o.f.sp.lycopersici* under *in vitro* condition. Also under *in vivo* condition, 300 mg L⁻¹ concentration of Ag-NPs (were made under dark condition) was more effectively than other concentrations and it could be reducing DI and DS. But yield of tomato with 300 mg L⁻¹ concentration of Ag-NPs was reduced regarding to Ag NPs toxicity effects.

Keywords: Disease severity, Disease incidence, Tomato, Silver nanoparticles, anti microbial effect Fusarium wilt.

1. Ph.D. Student of Department of Horticultural Science, Assistant Professor, Department of Plant Protection, Science Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Associate Professor of Department of Horticultural Science, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Associate Professor of National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, and Assistant Professor Department of Chemistry, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran, respectively.

* Corresponding author, Email: (Zarrinnia@srbiau.ac.ir).