



مقاله پژوهشی

کارآیی غلظت‌های مختلف میکروکپسول دربردارنده *Talaromyces flavus* با دو فرمولاسیون پودر و سوسپانسیون

در کنترل بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی

محمد حسین شعبانی^۱، لاله نراقی^۲، مژده ملکی^۳، مریم نگهبان^۴

۱-۳- به‌ترتیب دانشجوی دکتری، استادیار گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا، ورامین، ایران؛

۲، ۴- به‌ترتیب دانشیار، استادیار، مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: بهمن ۱۴۰۰؛ تاریخ پذیرش: تیر ۱۴۰۱)

چکیده

در این تحقیق، کارآیی فرمولاسیون‌های میکروکپسول پودر و میکروکپسول سوسپانسیون *Talaromyces flavus* با غلظت‌های 2×10^6 ، 4×10^6 ، 6×10^6 ، 8×10^6 و 10^7 واحد پرگنه ساز در هر گرم فرمولاسیون با روش افزودن به خاک و غلظت 10^7 واحد پرگنه ساز در هر گرم فرمولاسیون با روش آغشته‌سازی بذر با قارچ کش ثبت شده تالارومین در دو روش آغشته‌سازی بذر برای کنترل بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی مقایسه شد. نتایج نشان داد که مؤثرترین تیمارها مربوط به غلظت‌های مخلف میکروکپسول سوسپانسیون با روش افزودن به خاک و میکروکپسول پودر با روش آغشته‌سازی بذر و بیش‌ترین غلظت آن (10^7 واحد پرگنه ساز در هر گرم) در روش افزودن به خاک بوده که از ۸۳ تا ۹۶ درصد موجب کاهش معنی‌دار درصد شدت بیماری در مقایسه با شاهد آلوده شد.

واژه‌های کلیدی: بیماری‌های گیاهی، فرمولاسیون، *Talaromyces flavus*، کنترل بیولوژیک

Efficacy of different concentrations of microcapsules containing *Talaromyces flavus* with two formulations of powder and suspension in controlling Fusarium wilt disease of tomato

M.H. SHABANI¹, L. NARAGHI², M. MALEKI³, M. NEGAHBAN⁴

1, 3. PhD. Student, Associate Professor, of Department of Plant Pathology, College of Agriculture, Varamin- Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran; 2, 4. Assistant Professor, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

Abstract

The efficiency of powder microcapsules and suspension microcapsules of *Talaromyces flavus* with concentrations of $10^6 \times 2$, $10^6 \times 4$, $10^6 \times 6$, $10^6 \times 8$ and 10^7 colony forming units per gram of formulation in soil addition method and a concentration of 10^7 colony forming units per gram of formulation in seed impregnation method was compared with registered fungicide Talaromin in two methods of seed impregnation and addition to soil to control Fusarium wilt disease of tomatoes. The results showed that the most effective treatments were related to the different concentrations of suspension microcapsules by soil addition method and powder microcapsules by seed coating method and the highest concentration (10^7 colony forming units per gram) in adding to soil method reduced significantly 83- 96% the severity of the disease compared to the infected control.

Keywords: Biological control, formulation, *Talaromyces flavus*, plant diseases

✉ lale_naraghi@yahoo.com

مقدمه

که به دلیل در برداشتن عامل زنده و تغییر پیوسته در فعالیت‌های بازدارندگی این عوامل، امکان ایجاد پدیده مقاومت در آفات نیز کاهش خواهد یافت (Tomasetto et al., 2017).

هدف از این بررسی، تعیین کارآیی میکروکپسول *T. flavus* با دو فرمولاسیون سوسپانسیون و پودر در کاهش درصد شدت بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی و مقایسه کارآیی آنها با قارچ کش ثبت شده‌ی تالارومین بود.

روش تحقیق

بررسی‌های آزمایشگاهی

تولید میکروکپسول در بردارنده قارچ بیوکترول *Talaromyces flavus* با فرمولاسیون سوسپانسیون

تولید میکروکپسول، تلفیقی از روش پلیمریزاسیون و شبکه‌ای شدن است که با ایجاد تغییراتی در روش (Negahban et al., 2011)، مطابق و متناسب با شرایط رشد قارچ بیوکترول (تغییر در مقدار یا نوع پلیمر، سورفکتانت‌ها و روغن‌ها، اسید چرب و مقدار دور همزن، دما) صورت گرفت. در فرآیند پلیمریزاسیون، فاز آلی شامل روغن گیاهی کرچک به همراه مخلوطی از عامل قارچی بیولوژیک بود که در فاز آبی متشکل از پلیمرهای آب دوست، مانند مخلوطی از پلیمر آلجینات، نشاسته و کیتوسان، اضافه گردید. سپس، به مجموع دو فاز، کراس لینکر کلرید کلسیم و همچنین سورفاکتانت‌ها و مواد همراه و روغن‌های اسید چرب افزوده شد و یکنواخت سازی در دمای ۳۵ درجه سلسیوس هم‌وزنایزر با دور ۵۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه صورت پذیرفت. در نهایت، ذرات پلیمر شبکه‌ای به صورت کپسول در اطراف ذرات قارچ تشکیل شد (Negahban et al., 2011).

تولید میکروکپسول در بردارنده قارچ بیوکترول *Talaromyces flavus* با فرمولاسیون پودر

برای تهیه میکروکپسول در شکل پودر، ابتدا کشت‌های ده روزه قارچ *T. flavus* از تشتک‌های پتری خارج شده و در اتاقک هود لامینار فلو قرار گرفت و سپس، بخش توده قارچی

طی تحقیقات انجام شده در ایران، نتایج مطلوب کاربرد سویه‌های مختلف قارچ مهارگر *Talaromyces flavus* برای کنترل برخی عوامل مهم بیماری‌زای خاکزاد نظیر *Verticillium dahliae*، *Rhizoctonia solani* و *Fusarium oxysporum*، *Verticillium albo-atrum* در چند محصول زراعی شامل پنبه، چغندر قند، سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی و خیار گلخانه‌ای به اثبات رسیده است (Naraghi et al 2010a؛ Naraghi et al 2010b؛ Naraghi et al 2010c). از آن جا که در تولید انبوه و تجاری سازی عوامل بیولوژیک، مسئله بازاریابی و جلب نظر مصرف کنندگان امر مهمی محسوب می‌شود. از اینرو امر تجاری سازی عامل بیولوژیک *T. flavus* و اهمیت تولید بیوفرمولاسیون‌های مختلف آن از جمله میکروفرمولاسیون‌ها ضروری به نظر رسید.

در دهه‌های اخیر میکرو تکنولوژی در زمینه‌های مختلف شیمیایی داروسازی، پزشکی و آفت‌کش‌های شیمیایی کشاورزی گسترش چشم‌گیری داشته است. موضوعی که سبب ضرورت تحقیق و توسعه در زمینه میکرو آفت کش‌ها می‌شود، پدیده مقاومت آفات نسبت به آفت کش‌ها می‌باشد؛ لذا معرفی میکرو آفت کش‌ها به پژوهشگران موجب رونق تحقیق و توسعه در این زمینه نسبتاً جدید می‌شود. با توجه به مشکلات زیست محیطی و هزینه‌های ناشی از مصرف مقادیر زیاد آفت کش‌های معمولی و نیز مشکلات ناشی از مقاومت آفات به این آفت کش‌ها تحقیق و توسعه در زمینه آفت‌کش‌های میکرو به‌عنوان یک ضرورت می‌تواند مطرح گردد.

در زمینه عدم مقاومت آفات به میکروآفت کش‌های در بردارنده عوامل زنده مهارگر شامل میکروارگانیزم‌های باکتریایی، قارچی و یا ویروسی از دو لحاظ، این موضوع بررسی شده؛ اول آن که به واسطه‌ی ویژگی زیست تخریب پذیر بودن اجزای متشکله این آفت کش‌ها، فرصتی برای رخداد پدیده مقاومت در آفات رخ نخواهد داد (Chaud et al., 2021) و دیگر آن

درجه سلسیوس به مدت یک ماه و نیم قرار گرفت و در طی این مدت در صورت مشاهده خشک شدن محتویات، مجدداً ۲۰ میلی لیتر آب مقطر سترون جهت ایجاد رطوبت افزوده شد. پس از این مدت، محتویات داخل کیسه‌ی سلوفان برای خشک شدن بر روی کاغذهای صافی گسترده شد و به‌عنوان بیوفرمولاسیون بر پایه دانش فنی پیشین استفاده شد.

تهیه زاملیه‌های بیماری‌زای پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی و تعیین میزان مصرفی آن برای کاربرد در گلخانه

در این مرحله برای تهیه‌ی زاملیه بیماری‌زای پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی از جدایه‌های FO-TO-S-V-1 (جدایه *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* به‌دست آمده از خاک مزرعه گوجه‌فرنگی در ورامین) استفاده شد. بیماری‌زایی این جدایه‌ها، طی تحقیق پیشین بر روی گوجه‌فرنگی و خیار گلخانه‌ای اثبات شده بود (Atfannejad Dezfouli et al., 2014).

تهیه زادمایه بیماری‌زای پژمردگی فوزاریومی با کمی تغییر مطابق روش (Khalil et al., 2003) انجام گرفت. بدین ترتیب که ابتدا کیسه‌های سلوفان دربردارنده ۲۰۰ گرم بذر ذرت و ۱۶۰ میلی‌لیتر آب شهر با اتوکلاو در شرایط فوق‌الذکر سترون شد. سپس انتقال دو تا سه قطعه پنج میلی‌متری کشت یک هفته‌ای از قارچ به کیسه‌های سلوفان و مخلوط سازی کامل محتویات داخل آن انجام گرفت و کیسه‌های سلوفان به مدت سه هفته در انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سلسیوس نگهداری شد. با مشاهده پوشش کامل سطوح بذور ذرت با میسلیم‌های قارچ، محتویات کیسه‌های سلوفان جهت خشک شدن در دمای آزمایشگاه گسترانده شد و به‌عنوان زادمایه بیماری‌زای مصرفی به‌صورت افزودن به‌خاک در گلخانه استفاده شد.

برای تعیین میزان مصرفی زادمایه بیماری‌زای پژمردگی فوزاریومی در گلخانه، بر مبنای تعداد 10^7 واحد پرگنه ساز (Colony Forming Unit یا CFU) در هر گرم خاک گلدان (Anitha and Rabeeth, 2009)، مقدار لازم زادمایه مصرفی برآورد

همراه با محیط کشت با دستگاه آسیاب برقی کاملاً به پودر تبدیل شد. پودر به‌دست آمده در بردارنده اسپوره‌های قارچ *T. flavus* در فاز آبی شامل مالتودکسترین (Maltodextrine)، زانتان گام (Xanthan Gum)، اسید چرب (Fatty acid)، اتانول آمید (Ethanol amid) و اسید اولئیک (Oleic acid) گسترانده شد و بعد از قرارگیری در دستگاه هموژنایزر با ۲۰۰۰ تا ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، به پودر تبدیل شد. برای خشک کردن فرمولاسیون میکروکپسول، محتویات از دستگاه هموژنایزر خارج شده و در اتاقک لامینار فلو در معرض هوا روی کاغذهای صافی بزرگ، گسترانده شد تا کاملاً محتویات خشک شده، پودر شدند.

تهیه بیوفرمولاسیون *T. flavus* بر پایه دانش فنی پیشین (تالارومین)

برای تهیه‌ی فرمولاسیون جامد از یک جدایه مؤثر *T. flavus* (TF-To-V-38): جدایه *T. flavus* شماره ۳۸ به‌دست آمده از خاک مزرعه گوجه‌فرنگی در ورامین) موجود در کلکسیون قارچ‌های آزمایشگاه تحقیقات میکروارگانیسم‌های مفید و از روش تغییر یافته‌ی (Naraghi et al., 2010a) استفاده شد. بدین ترتیب که مقداری سیوس برنج به مدت ۲۴ ساعت در آبی با دمای (۳۵-۳۰ درجه سلسیوس) خیسانده شده، سپس بر روی کاغذهای صافی بزرگ گسترانیده و خشک گردید. در مرحله‌ی بعد به‌میزان ۲۵۰ گرم از سیوس برنج در کیسه‌های سلوفان در اتوکلاو (فشار یک و نیم اتمسفر، حرارت ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه) سترون شد. در مرحله‌ی بعد، برای تهیه‌ی بیوفرمولاسیون، سوسپانسیونی محتوی ۴۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون و شش قطعه نیم سانتی‌متری از محیط کشت ۱۰ روزه جدایه *T. flavus* در کیسه‌های سلوفان ریخته شد. سپس، از ترکیب تثبیت کننده نیترات سدیم، بر اساس میزان افزودن مکمل‌ها (هر گونه ترکیبی غیر از بستر اصلی کشت و قارچ) به بسترهای کشت (ده میلی‌لیتر از محلول مکمل به‌میزان ۲۰ گرم در لیتر برای ۲۵۰ گرم از هر بستر) افزوده شد (Engelkel et al., 1997). برای رشد جدایه *T. flavus*، کیسه‌ی سلوفان در انکوباتور ۳۰

کشت در گلدان‌های پلاستیکی با قطر دهانه ۲۰ سانتی‌متر و با حجمی در حدود سه لیتر انجام شد. خاک مورد استفاده در گلدان‌ها از نسبت مساوی کمپوست، ورمیکولیت و پیت ماس تشکیل شد. در این بررسی‌ها، از رقم رایج فلات استفاده گردید. برای جوانه زنی دمای مطلوب ۱۸ تا ۲۴ درجه سلسیوس بود و پس از آن بوته‌ها در دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه سلسیوس و با میانگین شدت نور ۱۰۰ وات بر متر مربع (حداقل ۱۶ ساعت روشنایی در روز) با آبیاری مرتب روزانه نگهداری شدند. برای تعیین درصد شدت بیماری، دو ماه پس از کاشت، از طریق مشاهده علائم آن با استفاده از یک مقیاس شامل شش درجه (Liu et al., 1995) به شرح ذیل مشخص شد:

صفر = بدون علائم بیماری

۱ = کلروز برگ و پژمردگی بوته کم تر از ۲۵ درصد

۲ = کلروز برگ و پژمردگی بوته از ۲۶ تا ۵۰ درصد

۳ = کلروز برگ و پژمردگی بوته از ۵۱ تا ۷۵ درصد

۴ = کلروز برگ و پژمردگی بوته از ۷۶ تا ۱۰۰ درصد

۵ = بوته مرده یا کاملاً از بین رفته

سپس، درصد شدت بیماری برای هر تیمار مطابق فرمول (Liu et al 1995) برای آزمون اثبات بیماری‌زایی به شرح ذیل محاسبه گردید:

$$\text{درصد شدت آلودگی} = \frac{\sum(n_i \times v_i) \times 100}{N \times V}$$

n: تعداد بوته‌های مربوط به هر درجه؛ v: شماره هر درجه؛

N: تعداد کل بوته‌ها؛ V: شماره بیش‌ترین درجه آلودگی (۵)

مقایسه‌ی میان تیمارها از طریق تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن و با استفاده از برنامه نرم‌افزاری MS TAT C صورت گرفت.

در روش افزودن به خاک برای میکروکپسول با دو فرمولاسیون سوسپانسیون و پودر به ترتیب ذیل عمل شد:

تعداد واحد پرگنه ساز برای میکروکپسول سوسپانسیون تهیه شده به میزان 2×10^9 واحد پرگنه ساز در هر گرم میکروکپسول سوسپانسیون شمارش شده بود، جهت تهیه غلظت‌های 2×10^6 ، 4×10^6 ، 6×10^6 ، 8×10^6 و 10^7 واحد پرگنه

گردید. بدین ترتیب که با محاسبه تعداد میکروکنیدی در هر گرم زادمایه، میزان زادمایه لازم برای مقدار خاک مورد استفاده در هر گلدان مشخص شد. برای تعیین تعداد اسپور در هر گرم از زادمایه، سوسپانسیونی از زادمایه با رقت یک هزارم تهیه شد و نسبت به شمارش تعداد میکروکنیدیوم در یک میلی‌لیتر از آن توسط لام هموسایتومتر اقدام گردید و بر این اساس، میزان زادمایه مصرفی برای گلدان در بردارنده سه کیلوگرم خاک، ۲۷ گرم تعیین شد.

ارزیابی کارآیی فرمولاسیون‌های میکروکپسول *T. flavus* در کنترل بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی

برای ارزیابی کارآیی میکروفرمولاسیون‌های *T. flavus* در کنترل بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی، آزمایشی گلخانه‌ای در قالب بلوک‌های کامل تصادفی با ۱۶ تیمار و پنج تکرار انجام گردید. تیمارها عبارت بودند از: تیمار شماره‌های یک تا پنج: میکروکپسول *T. flavus* در حالت سوسپانسیون با غلظت‌های 2×10^6 ، 4×10^6 ، 6×10^6 ، 8×10^6 و 10^7 واحد پرگنه ساز در هر گرم فرمولاسیون برای روش افزودن به خاک، تیمار شش: میکرو کپسول *T. flavus* در حالت سوسپانسیون با غلظت 10^7 واحد پرگنه ساز در هر گرم فرمولاسیون در روش آغشته‌سازی بذر، تیمار هفت تا یازده: میکروکپسول *T. flavus* در حالت پودر با غلظت‌های 2×10^6 ، 4×10^6 ، 6×10^6 ، 8×10^6 و 10^7 واحد پرگنه ساز در هر گرم فرمولاسیون برای روش افزودن به خاک، تیمار دوازده: میکروکپسول *T. flavus* در حالت پودر با غلظت 10^7 واحد پرگنه ساز در هر گرم فرمولاسیون در روش آغشته‌سازی بذر، تیمار سیزده: فارچ کش بیولوژیک ثبت شده تالارومین با روش افزودن به خاک بر اساس دستورالعمل موجود در بسته بندی (۲۵ کیلوگرم در هکتار با 10^9 واحد پرگنه ساز در هر گرم فارچ کش)، تیمار چهارده: فارچ کش بیولوژیک ثبت شده تالارومین با روش آغشته‌سازی بذر (۱۰۰ گرم برای آغشته‌سازی بذر مصرفی به میزان پانصد گرم در هکتار)، تیمار پانزده: شاهد سالم، تیمار شانزده: شاهد آلوده.

میکروکپسول پودر، به ترتیب میزان ۱/۲، ۲/۴، ۳/۶، ۴/۸ و ۶ میکرولیتر از هر یک از آن‌ها به حجم ۱۲ میلی لیتر رسانیده شد. بر حسب تیمار، فرمولاسیون مربوطه تا عمق کاشت در زمان قراگیری بذر به خاک افزوده شد. در روش افزودن به خاک برای قارچ کش تالارومین براساس دستورالعمل قارچ کش (۲۵ کیلوگرم در هکتار) عمل شد و مطابق توضیح شرح داده شده اخیر، بر اساس سطح گلدان، میزان محاسبه شده به کار گرفته شد. در روش آغشته سازی بذر، بر حسب تیمار، سطوح بذر با هر یک از فرمولاسیون‌های میکروکپسول به صورت بذر مال با غلظت ۱۰^۷ واحد پرگنه ساز در هر گرم فرمولاسیون و قارچ کش تالارومین نیز به صورت بذر مال بدون کاربرد هیچ گونه چسباننده‌ای پوشش داده شد.

نتایج

معرفی کیفی و کمی ترکیبات به کار رفته در صد گرم از میکروکپسول‌های تهیه شده

در این تحقیق، اجزای ترکیبات به کار رفته در صد گرم از هر یک از فرمولاسیون‌های سوسپانسیون و پودر به صورت کیفی و کمی به شرح ذیل در جدول ۱ قید شده است.

ساز در هر گرم فرمولاسیون، به ترتیب یک، دو، سه، چهار و پنج گرم از فرمولاسیون به حجم هزار میلی لیتر رسانیده شد تا غلظت‌های فوق حاصل گردید. همچنین، تعداد واحد پرگنه ساز برای میکروکپسول پودر تهیه شده به میزان ۲×۱۰^{۱۰} واحد پرگنه ساز در هر گرم میکروکپسول پودر شمارش شده بود، جهت تهیه غلظت‌های ۲×۱۰^۶، ۴×۱۰^۶، ۶×۱۰^۶، ۸×۱۰^۶ و ۱۰^۷ واحد پرگنه ساز در هر گرم فرمولاسیون، به ترتیب یک دهم، دو دهم، سه دهم، چهار دهم و پنج دهم (نیم) گرم از فرمولاسیون به حجم هزار میلی لیتر رسانیده شد تا غلظت‌های فوق حاصل گردید.

با توجه به این که بر اساس منابع در روش افزودن به خاک، حجم کل پوشش دهی به میزان ۴۰۰ لیتر برای یک هکتار معادل ده هزار متر مربع منظور گردیده، حجم کل مصرفی از محلول هر یک از فرمولاسیون‌های مورد استفاده برای گلدان‌هایی با مساحت تقریبی سه صدم متر مربع، با ضریب سه ضرب در ده به توان منهای شش، به میزان ۱/۲ میلی لیتر (۱۲۰۰ میکرولیتر) برآورد گردید. بنابراین، برای تهیه دزهای مصرفی یک تا پنج در هزار از فرمولاسیون میکروکپسول سوسپانسیون، به ترتیب میزان ۱/۲، ۲/۴، ۳/۶، ۴/۸ و ۶ میکرولیتر از هر یک از آن‌ها به حجم ۱۲۰۰ میکرولیتر رسانیده شد و برای تهیه دزهای مصرفی یک دهم تا پنج دهم در هزار از فرمولاسیون

جدول ۱- میزان ترکیبات به کار رفته در صد گرم از هر یک از فرمولاسیون‌های میکروکپسول.

Table 1. The amount of compounds used in one hundred grams of each microcapsule formulation.

Microcapsule as suspension form		Microcapsule as powder form	
Component	Amount of component (g)	Component	Amount of component (g)
Fungal biological agent*	53.00	Fungal biological agent**	5.00
Urea	9.00	Maltodextrin	5.41
Formaldehyde	5.18		
Castor oil	5.40	Starch	5.33
Coconut fatty acid	5.40	Fatty acid (Ethanamide and Oleic acid)	5.80
Sodium chloride 1%	2.00	Xanthan gum	5.80
Surfactant (Tween 20)	5.50		
Butanol***	3.00	Butanol***	3.00

*عامل قارچی مهارگر *T. flavus* در فرمولاسیون میکروکپسوله با شکل سوسپانسیونی به صورت سوسپانسیونی از اسپوره‌های قارچ با غلظت ۱۰^۹ اسپور در هر میلی لیتر استفاده شد.

**عامل قارچی مهارگر *T. flavus* در فرمولاسیون میکروکپسوله با شکل پودر به صورت پودر خشک از کشت ده روزه قارچ با غلظت ۱۰^۹ واحد تشکیل دهنده پرگنه در هر گرم استفاده شد.

***از بوتانول برای جلوگیری از آلودگی‌های احتمالی باکتریایی و قارچی استفاده شد.

* *T. flavus* in the formulation of nanocapsules with suspension form, was used with a concentration of 10⁹ spores per ml.

** *T. flavus* in nanocapsules as dry powder formulation was used as ten-day culture of the fungus with a concentration of 10⁹ CFU per gram of dry powder

***Butanol was used to prevent possible bacterial and fungal contaminations

گروه‌بندی میانگین‌های درصد شدت بیماری در تیمارهای مختلف، کلیه تیمارها در ۸ گروه آماری قرار گرفتند (جدول ۳). همه تیمارهای در بردارنده هر یک از فرمولاسیون‌های میکرو (سوسپانسیون و پودر) در روش افزودن به خاک با غلظت‌های مختلف و روش آغشته‌سازی بذر و قارچ‌کش تالارومین با دو روش افزودن به خاک و آغشته‌سازی بذر نسبت به شاهد آلوده باعث کاهش معنی دار درصد شدت بیماری شدند (جدول ۳). در این میان، شش تیمار، از لحاظ درصد شدت بیماری همراه با شاهد سالم در یک گروه آماری قرار گرفتند (جدول ۳). این تیمارها عبارت بودند از: غلظت‌های مختلف میکروکپسول سوسپانسیون به استثنای غلظت 4×10^6 واحد پرگنه ساز در هر گرم با روش افزودن به خاک، میکروکپسول پودر با غلظت 4×10^6 واحد پرگنه ساز در هر گرم با روش افزودن به خاک و میکروکپسول پودر با روش آغشته‌سازی بذر (جدول ۳).

تعیین میزان مصرفی زادمایه بیماری‌زای پژمردگی فوزاریومی برای کاربرد در گلخانه

در این مرحله، در هر میلی‌لیتر از سوسپانسیون مربوط به زادمایه بیماری با رقت یک هزارم، $1/11 \times 10^6$ میکروکندیدی ($1/11 \times 10^9$ در هر گرم زادمایه) محاسبه شد. با توجه به میزان 10^7 میکروکندیدی مورد نیاز برای هر گرم خاک (3×10^{11} میکروکندیدی مورد نیاز برای سه کیلوگرم خاک)، میزان زادمایه مصرفی برای گلدان در بردارنده سه کیلوگرم خاک، ۲۷ گرم تعیین شد.

تعیین کارآیی غلظت‌های مختلف فرمولاسیون‌های میکروکپسول *T. flavus* و قارچ‌کش تالارومین در کنترل بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی

اثر بیوفرمولاسیون *T. flavus* بر پایه دانش فنی قبلی (تالارومین) و غلظت‌های مختلف میکروکپسول *T. flavus* در کنترل بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی در سطح احتمال یک درصد معنی دار بود (جدول ۲). براساس نتایج

جدول ۲- تجزیه واریانس درصد شدت بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی در تیمارهای فرمولاسیون‌های میکروکپسول در بردارنده *Talaromyces flavus* و تالارومین.

Table 2. Analysis of variance of tomato Fusarium wilt disease severity in treatments of microcapsule formulations containing *Talaromyces flavus* and Talaromin.

Variation sources	Degree of freedom (DF)	Sum squares (SS)	Mean squares (MS)	F value	Probability level (P)
Replication	4	273.478	68.369	1.1947 ^{ns}	0.3223
Treatment	15	27897.781	1859.852	4992/32 ^{**}	0.0000
Error	60	3433.662	57.228		
Total	79	31684.921			
Coefficient Variation (C. V.)	30.64%				

ms. میان تکرارها آزمایش اختلاف آماری معنی‌داری وجود ندارد.

** : میان تیمارهای مختلف اختلاف آماری معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد وجود دارد.

ns: There is no statistically significant difference between the replications of the experiment.

** : There is a statistically significant difference between different treatments at the level of 1% probability.

جدول ۳- شدت بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی در تیمارهای مختلف شامل فرمولاسیون‌های میکروکپسول در بردارنده *Talaromyces flavus* و تالارومین.

Table 3. Severity of Fusarium wilt disease of tomatoe in diffe rent treatments including microformulations containing *Talaromyces flavus* and Talaromin.

Treatment	Tomato Fusarium wilt disease severity (%)
MS ¹	2×10 ⁶ CFU/g –soil drench
MS	13.33 defghi*
MS	15.20 cdefgh
MS	3.20 hi
MS	5.00 ghi
MS	10.79 efghi
MS	20.00 cdef
MP ²	2×10 ⁶ CFU/g –soil drench
MP	40.00 b
MP	26.00 cd
MP	28.00 bc
MP	17.77 cdefg
MP	6.66 fghi
MP	8.00 fghi
MP	23.60 cde
Talaromin – soil drench	15.20 cdefgh
Talaromin –Seed coating	0 i
Healthy control	80.50 a
Infected control	

* میانگین‌های با حروف آماری مشابه، اختلاف آماری معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد ندارند.

1-MS, Microsuspension concentration

2-MP, Micropowder concentration

*There is no statistically significant difference between the means with similar statistical letters at the level of one percent probability.

بحث

نتایج کلی این تحقیق نشان داد که میکروکپسول‌های دربردارنده *Talaromyces flavus* با دو فرمولاسیون سوسپانسیون و پودر با روش‌های مختلف کاربرد (و افزودن به خاک در غلظت‌های 2×10^6 ، 4×10^6 ، 6×10^6 و 8×10^6 و 10^7 واحد پرگنه ساز در هر گرم فرمولاسیون و آغشته‌سازی بذر) در مقایسه با شاهد آلوده موجب کاهش معنی‌دار شدت بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی شده است.

در تحقیق حاضر، نتایج به‌دست آمده از اثر میکروکپسول‌های تهیه شده روی میزان درصد شدت بیماری‌های مورد مطالعه به سبب تأثیر این ترکیبات روی عوامل بیماری‌زای قارچی بیماری‌های مورد مطالعه اتفاق افتاده است. تا کنون، گزارشی در حوزه کشاورزی در زمینه بررسی تأثیر میکرو یا میکرو قارچ‌کش‌های در بردارنده عوامل بیولوژیکی قارچی زنده روی بیماری‌های گیاهی وجود نداشته است. در حالیکه، نتایج تحقیقاتی در خارج و داخل کشور در خصوص تولید میکرو قارچ‌کش‌های در بردارنده عامل بیولوژیکی غیر زنده و بررسی کارایی آن‌ها در کنترل بیماری‌های گیاهی گزارش شده است. در خارج از کشور، در تحقیقی، تولید میکرو قارچ‌کش با کاربرد میکروذرات دی اکسیدتیتانیوم در قالب میکرومولسیون برای کنترل برخی بیماری‌های گیاهی گزارش شده است (Abd-Elsalam and Alghuthayni, 2015). در داخل کشور نیز میکرو قارچ‌کش با استفاده از ترکیبات آلی روی بیماری پوسیدگی یقه توتون بررسی شده است. نتایج این تحقیق نشان داده که میکرو قارچ‌کش سنتز شده روی کنترل پوسیدگی یقه توتون مؤثر بوده است (Sajjadi, 2014). در حوزه پزشکی، تحقیقی در رابطه با تأثیر بازدارندگی میکروفرمولاسیون دربردارنده قارچ *Penicillium fellutanum* روی قارچ *Candida albicans* وجود دارد که در شرایط آزمایشگاهی در تشک‌های پتری، هاله‌های مربوط به عدم رشد قارچ بیماری‌زا در اطراف قرص‌های میکروفرمولاسیون نشان داده شده است (Khan and Jameel, 2016).

نتایج به‌دست آمده از بررسی گلخانه‌ای در این تحقیق در زمینه کارایی این ترکیبات در کنترل بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی را می‌توان بر اساس تحقیقات آزمایشگاهی پیشین به جمعیت فعال اسپور در یک زمان معین، حفظ و پایداری آن‌ها در پوشش‌های میکرو کپسول نسبت داد (Naraghi et al., 2018). نتایج تحقیقات پیشین نشان داد، در میکروکپسول‌های مختلف دربردارنده *T. flavus* تهیه شده به‌صورت سوسپانسیون، امولسیون و پودر از زمان تولید تا شش ماه پس از آن میزان اسپور قارچ و میزان جمعیت فعال قارچ از 10^8 در هر گرم از فرمولاسیون بیش‌تر بوده است، براساس تحقیقات مشابهی، دامنه تعداد واحد پرگنه ساز از عامل زنده قارچی یا باکتریایی در یک فرآورده بیولوژیک میان 10^7 تا 10^9 گزارش شده است (Johnson and Dileone, 1999; Hammoudi et al., 2012).

تأکید بر ذکر جمعیت 10^7 تا 10^9 واحد پرگنه ساز در هر گرم از فرمولاسیون‌های دربردارنده عوامل بیوکنترل قارچی، به‌علت خودخوری اسپورها در اثر پدیده Crowding effect می‌باشد (Chitarra, 2003). در این پدیده نشان داده شده که اگر جمعیت قارچ بسته به نوع قارچ از میزان معینی تجاوز نماید، اسپورهای قارچ شروع به خودخوری نموده و جمعیت کاهش می‌یابد، با تحقیقات انجام گرفته در زمینه قارچ‌هایی از رده آسکومیسیت‌ها نظیر قارچ تریکودرما به این نتیجه رسیده شده که با رسیدن جمعیت به 10^{10} این پدیده اتفاق می‌افتد (Chitarra, 2003). بنابراین، در این تحقیق ضروری به‌نظر رسید که در زمینه کارایی جمعیت‌های پایین‌تر از 10^7 نظیر 10^6 نیز ارزیابی صورت پذیرد تا از این موضوع جهت کاهش غلظت مصرف این گونه فرآورده‌ها، هر چه بیش‌تر بهره‌مندی حاصل شود.

نتیجه‌گیری کلی این است که این گونه فرمولاسیون‌های میکروکپسول *T. flavus* در حالات مختلف سوسپانسیون و پودر می‌تواند به‌عنوان یک فرآورده بیولوژیک مؤثر برای مدیریت پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی به‌کار گرفته شود. بنابراین، برای بیش‌ترین بهره‌برداری از کارایی آن‌ها در سطح وسیع، ضروری است که این فرمولاسیون‌ها در سطح

سپاسگزاری

بدینوسیله از همکاری موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور به‌خاطر فراهم نمودن امکانات و شرایط اجرای این پژوهش، صمیمانه سپاسگزاری می‌گردد.

گلخانه‌های تجاری نیز آزمایش شده و مؤثرترین آن‌ها برای رسیدن به اهدافی چون افزایش شاخص‌های رویشی و کاهش شاخص‌های بیماری برای فرآیند تجاری سازی و تولید انبوه انتخاب شود.

References

- ABD-ELSALAM, K. A. and M. A. ALGHUTHAINY. 2015. Nanobiofungicides: are they next generation of fungicides. Journal of Nanotechnology and Materials Science, No. 2: 1-3.
- ANITHA, A. and M. RABEETH. 2010. Degradation of fungal cell walls of phytopathogenic fungi by lytic enzyme of *Streptomyces griseus*. African Journal of Plant Science, No. 4: 61-66.
- ATFANNEJAD DEZFOOLI, R., L. NARAGHI and A. NIAZMAND. 2014. A comparative study on different antagonistic mechanisms of *Talaromyces flavus* and *Trichoderma harzianum* in terms of growth inhibition of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, causal agent of tomato wilt disease in laboratory conditions. International Journal of Research and Review, No. 2: 115-127.
- CHAUD, M., E. B. SOUTO, A. ZIELINSKA, P. SEVERINO, F. BATAIN, J. OLIVERIA-JUNIOR and T. ALVES. 2012. Nanopesticides in Agriculture: Benefits and Challenge in Agricultural Productivity, Toxicological Risks to Human Health and Environment. Toxics, No. 9: 131.
- CHITARRA, G. S. 2003. Germination inhibitors of fungal spores: Identification and mode of action. Ph.D. thesis Wageningen University, Wageningen, The Netherlands. With summaries in English and Dutch), 120 pages.
- ENGELELKES, C. A., R. L. NUCLO and D. R. FRAVEL. 1997. Effect of carbon, Nitrogen, and CN ratio on growth, sporulation, and biocontrol efficacy of *Talaromyces flavus*. Phytopathology, No. 87: 500-505.
- HAMMOUDI, O., M. SALAN, R. ABUAMSHA and R. EHLERS. 2012. Effectiveness of bacterial and fungal isolates to control *Phoma lingam* on oilseed rape, *Brassica napus*. American Journal of Plant sciences, No. 3: 773-779.
- JOHNSON, k. B. and J. A. DILEONE. 1999. Effect of antibiosis on antagonist dose-plant disease response relationships for the biological control of crown gall of tomato and cherry. Phytopathology, No. 89: 974-980.
- KHALIL, M. S., M. A. ABDEL-SATTAR, I. N. ALEY, K. A. ABED-ELSALAM and J. A. VERREET. 2003. Genetic affinities of *Fusarium* spp. and their correlation with origin and pathogenicity. African Journal of Biotechnology, No. 2: 109-113.
- KHAN, N. T. and N. JAMEEL. 2016. Antifungal activity of silver nanoparticles produced from fungus, *Penicillium fellutanum* at different pH. Journal of Microbial and Biochemical Technology, No. 8: 440-443.
- LIU, L., J. W. KLOPPER and S. TUZUN. 1995. Induction of systemic resistance in cucumber against *Fusarium* wilt by plant growth promoting rhizobacteria. Phytopathology, No. 85: 695-698.
- NARAGHI, L., A. HEYDARI, S. REZAEI and M. RAZAVI. 2010a. Biological control of greenhouse cucumber *Verticillium* wilt disease by *Talaromyces flavus*. Phytopathologia Mediterranea, No. 49: 321-329.
- NARAGHI, L., A. HEYDARI, S. REZAEI, M. RAZAVI and H. JAHANIFAR. 2010b. Study on antagonistic effects of *Talaromyces flavus* on *Verticillium albo-atrum*, the causal agent of potato wilt disease. Crop Protection, No. 29: 658-662.

- NARAGHI, L., A. HEYDARI, S. REZAEI, M. RAZAVI, H. GAHANIFAR and E. MAHMOODI KHALEDI. 2010c. Biological control of tomato Verticillium wilt disease by *Talaromyces flavus*. Journal of Plant Protection Research, No. 50: 360-365.
- NARAGHI, L., M. NEGAHBAN, A. HEYDARI, M. RAZAVI and H. AFSHARI AZAD. 2018. The effects of nanoparticles on sporulation and active population of *Talaromyces flavus*. International Journal of Bio-Technology and Research, No. 8: 27-38.
- NEGAHBAN, M., S. MOHARAMIPOUR, M. ZANDI and M. H. PEZESHKI. 2011. Oil nano-encapsulation by coacervation method on nutritional indices of *Tribolium castaneum* (Col: Tenebrionidae). The International journal of artificial organs, No. 34: 667-667.
- SAJJADI, A. 2014. The effect of synthetic nanofertilizer on tobacco collar rot. Proceedings of the 21st Iranian Plant Protection Congress, Urmia University, September 1-4, 2014, page 135.
- TOMASSETO, F., J. M. TYLIANAKIS, M. REALE, S. WRATTEN and S. L. GOLDSON. 2017. Intensified agriculture favors evolved resistance to biological control. Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America, No. 114: 3885-3890.