Applied Entomology and Phytopathology
Vol. 90, No. 1, Sep. 2022
DOI: 10.22092/JAEP.2022.355643.1409

آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۹۰، شماره ۱، شهریور ۱۴۰۱

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 و ۳- به‌ترتیب دانشجوی دکتری و استادیار گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا، ورامین، ایران؛
۲و ٤ - به‌ترتیب دانشیار و استادیار مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: بهمن ۱٤۰۰؛ تاریخ پذیرش: تیر ۱٤۰۱)

چکیده

در این تحقیق، کارآیی فرمولاسیون‌های میکروکپسول پودر و میکروکپسول سوسپانسیون *Talaromyces flavus* با غلظت‌های $۲×۱۰^{٦}$، $٤×۱۰^{٦}$، $٦×۱۰^{٦}$، $۸×۱۰^{٦}$ و $۱۰^{۷}$ واحد پرگنه ساز در هر گرم فرمولاسیون با روش افزودن به خاک وغلظت $۱۰^{۷}$ 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 به‌غلظت‌های مختلف میکروکپسول سوسپانسیون با روش افزودن به خاک و میکروکپسول پودر با روش آغشته‌سازی بذر و بیش‌ترین غلظت آن ($۱۰^{۷}$ واحد پرگنه ساز در هر گرم) در روش افزودن به خاک بوده که از ۸۳ تا ۹٦ 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. SHABANI[1], L. NARAGHI[2]✉, M. MALEKI[3], M. NEGAHBAN[4]

1 & 3. PhD. Student and Associate Professo 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

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*، *Verticillium albo-atrum*، *Fusarium oxysporum* و *Rhizoctonia solani* در چند محصول زراعی شامل پنبه، چغندرقند، سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی و خیار گلخانه‌ای به‌اثبات 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 به‌نظر 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 می باشد؛ 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 دربردارنده عوامل زنده مهارگر شامل میکروارگانیسم‌های 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 که به‌دلیل دربرداشتن 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 بیوکنترل *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 بیوکنترل (تغییر در مقدار یا نوع پلیمر، سورفکتنت‌ها و روغن‌ها، اسید چرب و مقدار دور همزن، دما) صورت گرفت. در فرآیند پلیمریزاسیون، فاز آلی شامل روغن گیاهی کرچک به‌همراه 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 هموژنایزر با دور ۵۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه صورت پذیرفت. در نهایت، ذرات پلیمر شبکه‌ای به‌صورت کپسول در اطراف ذرات قارچ تشکیل شد (Negahban *et al.*, 2011).

تولید میکروکپسول در بردارنده قارچ بیوکنترل *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

همراه با محیط کشت با دستگاه آسیاب برقی کاملاً به پودر تبدیل شد. پودر به‌دست آمده در بردارنده اسپورهای 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 سبوس برنج به‌مدت ۲٤ ساعت در آبی با دمای (۳۰-۳۵ درجه سلسیوس) خیسانده شده، سپس بر روی کاغذهای صافی بزرگ گسترانیده و خشک گردید. در مرحله ی بعد به‌میزان ۲۵۰ گرم از سبوس برنج در کیسه‌های سلوفان در اتوکلاو (فشار یک و نیم اتمسفر، حرارت۱۲۱ درجه سلسیوس به‌مدت ۲۰ دقیقه) سترون شد. در مرحله ی بعد، برای تهیه‌ی بیوفرمولاسیون، سوسپانسیونی محتوی ٤۰ میلی لیتر 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 (Engelelkes *et al.*, 1997). برای رشد جدایه *T. flavus*، کیسه‌ی سلوفان درانکوباتور ۳۰ درجه سلسیوس به‌مدت 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 زادمایه‌های بیماری‌زای پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی و تعیین میزان مصرفی آن برای کاربرد در گلخانه

در این مرحله برای تهیه‌ی زادمایه بیماری‌زای پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی از جدایه‌هایFO-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 Dezfooli *et al.*, 2014).

تهیه زادمایه بیماری‌زای پژمردگی فوزاریومی با کمی تغییر مطابق روش Khalil *et al.* (2003) انجام گرفت. بدین‌ترتیب که ابتدا کیسه‌های سلوفان دربردارنده ۲۰۰ گرم بذر ذرت و ۱٦۰ میلی‌لیتر آب شهر با اتوکلاو در شرایط فوق الذکر 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 به‌مدت سه هفته در انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سلسیوس نگهداری شد. با مشاهده پوشش کامل سطوح بذور ذرت با میسلیوم‌های 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 $۱۰^{۷}$ واحد پرگنه ساز (Colony Forming Unit یا CFU) در هر گرم خاک گلدان (Anitha and Rabeeth, 2009)، مقدار لازم زادمایه مصرفی برآورد

گردید. بدین‌ترتیب 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 به‌شمارش تعداد میکروکنیدیوم در یک میلی‌لیتر از آن توسط لام هموسایتومتر اقدام گردید و بر این اساس، میزان زادمایه مصرفی برای گلدان دربردارنده 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 ۱٦ تیمار و پنج تکرار انجام گردید. تیمارها عبارت بودند از: تیمار شماره‌های یک تا پنج: میکروکپسول *T. flavus* در حالت سوسپانسیون با غلظت‌های ۲×۱۰^{٦}، ٤×۱۰^{٦}، ٦×۱۰^{٦}، ۸×۱۰^{٦} و $۱۰^{۷}$ واحد پرگنه ساز در هر گرم فرمولاسیون برای روش افزودن به خاک، تیمار شش: میکرو کپسول *T. flavus* در حالت سوسپانسیون با غلظت $۱۰^{۷}$ واحد پرگنه ساز در هر گرم فرمولاسیون در روش آغشته‌سازی بذر، تیمار هفت تا یازده: میکروکپسول *T. flavus* در حالت پودر با غلظت‌های ۲×۱۰^{٦}، ٤×۱۰^{٦}، ٦×۱۰^{٦}، ۸×۱۰^{٦} و $۱۰^{۷}$ واحد پرگنه ساز در هر گرم فرمولاسیون برای روش افزودن به خاک، تیمار دوازده: میکروکپسول *T. flavus* در حالت پودر با غلظت $۱۰^{۷}$ واحد پرگنه ساز در هر گرم فرمولاسیون در روش آغشته سازی بذر، تیمار سیزده: قارچ کش بیولوژیک ثبت شده تالارومین با روش افزودن به خاک بر اساس دستورالعمل موجود در بسته بندی (۲۵ کیلوگرم در هکتار با $۱۰^{۹}$ واحد پرگنه ساز در هر گرم قارچ کش)، تیمار چهارده: قارچ کش بیولوژیک ثبت شده تالارومین با روش آغشته سازی بذر (۱۰۰ گرم برای آغشته سازی بذر مصرفی به‌میزان پانصد گرم در هکتار)، تیمار پانزده: شاهد سالم، تیمار شانزده: شاهد آلوده.

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 ۲٤ 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 ۱٦ 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) به‌شرح ذیل مشخص شد:

صفر= بدون علائم بیماری

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

۲= کلروز برگی و پژمردگی بوته از ۲٦ تا ۵۰ درصد

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

٤= کلروز برگی و پژمردگی بوته از ۷٦ 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 به‌شرح ذیل محاسبه گردید:

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

n: تعداد بوته‌های مربوط به‌هر 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 به‌ترتیب ذیل عمل شد:

تعداد واحد پرگنه ساز برای میکروکپسول سوسپانسیون تهیه شده به‌میزان ۲×۱۰^{۹} واحد پرگنه ساز در هر گرم میکروکپسول سوسپانسیون شمارش شده بود، جهت تهیه غلظت‌های ۲×۱۰^{٦}، ٤×۱۰^{٦}، ٦×۱۰^{٦}، ۸×۱۰^{٦} و $۱۰^{۷}$ واحد پرگنه

ساز در هر گرم فرمولاسیون، به‌ترتیب یک، دو، سه،چهار و پنج گرم ازفرمولاسیون به حجم هزار میلی‌لیتر رسانیده شد تا غلظت‌های فوق حاصل گردید. همچنین، تعداد واحد پرگنه ساز برای میکروکپسول پودر تهیه شده به‌میزان $۲×۱۰^{۱۰}$ 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، به‌ترتیب یک دهم، دو دهم، سه دهم،چهار دهم و پنج دهم (نیم) گرم ازفرمولاسیون 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 به‌میزان 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 به‌توان منهای شش، به‌میزان ۱/۲ میلی لیتر (۱۲۰۰ میکرولیتر) برآورد گردید. بنابراین، برای تهیه دزهای مصرفی یک تا پنج در هزار از فرمولاسیون میکروکپسول سوسپانسیون، به‌ترتیب 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 میکروکپسول پودر، به‌ترتیب 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 به‌کار گرفته شد.

در روش آغشته سازی بذر، بر حسب تیمار، سطوح بذر با هر یک از فرمولاسیون‌های میکروکپسول به‌صورت بذر مال با غلظت $۱۰^{۷}$ واحد پرگنه ساز در هر گرم فرمولاسیون و قارچ کش تالارومین نیز به‌صورت بذر مال بدون کاربرد هیچ گونه چسباننده‌ای پوشش داده شد.

نتایج

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

در این تحقیق، اجزای ترکیبات به‌کار رفته در صد گرم از هر یک از فرمولاسیون‌های سوسپانسیون و پودر به‌صورت کیفی و کمی به‌شرح ذیل در جدول ۱ قید شده است.

جدول ۱– میزان ترکیبات به‌کار 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	**Amounth of component (g)**	**Component**	**Amounth 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 (Ethanolamide 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 سوسپانسیون به‌صورت سوسپانسیونی از اسپورهای قارچ با غلظت $۱۰^{۹}$ اسپور در هر میلی لیتر استفاده شد.

**عامل قارچی مهارگر *T. flavus* در فرمولاسیون میکروکپسوله با شکل پودر به‌صورت 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 10^9 spores per ml.

** *T. flavus* in nanocapsules as dry powder formulation was used as ten-day culture of the fungus with a concentration of 10^9 CFU per gram of dry powder

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

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، $۱/۱۱\times۱۰^{۶}$ میکروکنیدی ($۱/۱۱\times۱۰^{۹}$ در هر گرم زادمایه) محاسبه شد. با توجه به‌میزان $۱۰^{۷}$ میکروکنیدی مورد نیاز برای هر گرم خاک (۳×۱۰^{۱۰} میکروکنیدی مورد نیاز برای سه کیلوگرم خاک)، میزان زادمایه مصرفی برای گلدان دربردارنده 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 معنی‌دار بود (جدول ۲). براساس نتایج گروه‌بندی میانگین‌های درصد شدت بیماری در تیمارهای مختلف، کلیه تیمارها در ۸ گروه آماری قرار گرفتند (جدول۳).همه تیمارهای دربردارنده 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 به‌استثنای غلظت ٤×۱۰^{٦} واحد پرگنه ساز در هر گرم با روش افزودن به خاک، میکروکپسول پودر با غلظت ٤×۱۰^{٦} واحد پرگنه ساز در هر گرم با روش افزودن به خاک و میکروکپسول پودر با روش آغشته‌سازی بذر (جدول ۳).

جدول ۲– تجزیه واریانس درصد شدت بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی در تیمارهای فرمولاسیون‌های میکروکپسول دربردارنده *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%				

ns: میان تکرارها ازمایش 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	13.33 defghi*
MS		15.20 cdefgh
MS	6×10^{6} CFU/g –soil drench	3.20 hi
MS	8×10^{6} CFU/g –soil drench	5.00 ghi
MS	10^{7} CFU/g –soil drench	10.79 efghi
MS	10^{7} CFU/g –Seed coating	20.00 cdef
MP [2]	2×106 CFU/g –soil drench	40.00 b
MP	4×106 CFU/g –soil drench	26.00 cd
MP	6×106 CFU/g –soil drench	28.00 bc
MP	8×106 CFU/g –soil drench	17.77 cdefg
MP	107 CFU/g –soil drench	6.66 fghi
MP	107 CFU/g –Seed coating	8.00 fghi
Talaromin – soil drench		23.60 cde
Talaromin –Seed coating		15.20 cdefgh
Healthy control		0 i
Infected control		80.50 a

* میانگین‌های با حروف آماری مشابه، اختلاف آماری معنی داری 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 $۲×۱۰^{۶}$، $۴×۱۰^{۶}$، $۶×۱۰^{۶}$، $۸×۱۰^{۶}$ و $۱۰^{۷}$ 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 بیماری زای قارچی بیماری‌های مورد مطالعه اتفاق افتاده است. تا کنون، گزارشی در حوزه کشاورزی در زمینه بررسی تأثیر میکروو یا میکرو قارچ کش‌های 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 قارچ کش‌های در بردارنده عامل بیولوژیکی غیر زنده و بررسی کارآیی آن‌ها در کنترل بیماری‌های گیاهی گزارش شده است. در خارج از کشور، در تحقیقی، تولید میکرو قارچ کش با کاربرد میکروذرات دی اکسیدتیتانیوم در قالب میکرواملسیون برای کنترل برخی بیماری‌های گیاهی گزارش شده است (Abd–Elsalam and Alghuthayni, 2015). در داخل کشور نیز میکرو قارچ کش با استفاده از ترکیبات آلی روی بیماری پوسیدگی یقه توتون بررسی شده است. نتایج این تحقیق نشان داده که میکرو قارچ کش 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 تشتک‌های 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 گلخانه ای در این تحقیق در زمینه کارآیی این ترکیبات در کنترل بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی را می توان 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 $۱۰^{۸}$ 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 $۱۰^{۷}$ تا $۱۰^{۹}$ گزارش شده است (Johnson and Dileone, 1999; Hammoudi *et al.*, 2012).

تأکید بر ذکر جمعیت $۱۰^{۷}$ تا $۱۰^{۹}$ 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 می یابد، با تحقیقات انجام گرفته در زمینه قارچ‌هایی از رده آسکومیست‌ها نظیر قارچ تریکودرما به این نتیجه رسیده شده که با رسیدن جمعیت به $۱۰^{۱۰}$ این پدیده اتفاق می‌افتد (Chitarra, 2003). بنابراین، در این تحقیق ضروری به‌نظر رسید که در زمینه کارآیی جمعیت‌های پایین تر از $۱۰^{۷}$ نظیر $۱۰^{۶}$ نیز ارزیابی صورت پذیرد تا از این موضوع جهت کاهش غلظت مصرف این گونه فرآورده‌ها، هر چه بیش تر 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 بهره برداری از کارآیی آن‌ها در سطح وسیع، ضروری است که این فرمولاسیون‌ها در سطح

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.

سپاسگزاری

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

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. REZAEE 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. REZAEE, 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. REZAEE, 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 *Ttribolium 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.