مقاله تحقیقی

تهیه و بهینه‌سازی فرمولاسیون‌های مایع و میکروکپسول *Talaromyces flavus* برای مدیریت بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی

لاله نراقی[۱]، سیدرضا فانی[۲]، صادق جلالی[۳]، مریم نگهبان[۴]، شهرام نعیمی[۵]

۱، ۴، ۵– دانشیار، استادیار، دانشیار، موسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

۲– استادیار، بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان یزد، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، یزد، ایران.

۳– مربی پژوهش، بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اصفهان، ایران.

مسئول مکاتبات: لاله نراقی ، ایمیل: lale_naraghi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۹/۰۴ ۱۸–۱(۱)۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۱۰

چکیده

با توجه به پیشرفت‌های اخیر در کاربرد زیست فناوری در علوم مختلف، در سال‌های اخیر نیز تحقیقاتی در زمینه تهیه انواع فرمولاسیون‌های زیستی مایع و میکروکپسول‌های سوسپانسیون و پودر از عامل مهم قارچی مهارگر *Talaromyces flavus* صورت پذیرفته است. در این بررسی، نسبت به بهینه‌سازی فرمولاسیون‌های مذکور و به کارگیری آن‌ها در گلخانه‌های تجاری اقدام شده است. بدین منظور، ابتدا یک نوع فرمولاسیون مایع (فرمولاسیون مایع دربردارنده محیط کشت Potato Dextrose Broth، دمای ۲۵ درجه سلسیوس و تثبیت‌کننده دی سیکلوسرین یا نیترات سدیم)، یک نوع میکروکپسول به شکل سوسپانسیون و نوعی میکروکپسول پودری برای کاربرد در گلخانه‌های گوجه‌فرنگی تهیه شد. برای بهینه‌سازی فرمولاسیون مایع، مناسب‌ترین امولسیون کننده‌ها و چسباننده‌ها از لحاظ سوسپانسیون شوندگی، Tween 20 و کربوکسی‌متیل‌سلولز مشخص شد. برای بهینه‌سازی میکروکپسول‌های سوسپانسیون و پودر نیز مناسب‌ترین ترکیب پلیمر+ سورفکتانت از لحاظ حلالیت‌پذیری به ترتیب ترکیب آلجینات+ مریستل الکل و گوارگام+ لیگنوسولفات کلسیم تعیین شد. بررسی‌های مربوط به گلخانه‌های تجاری، طی یک سال در دو منطقه یزد و اصفهان با سابقه آلودگی به بیماری پژمردگی فوزاریومی انجام شد. هر بررسی در قالب طرح آماری بلوک‌های کامل تصادفی با هشت تیمار در چهار تکرار انجام گرفت . تیمارها عبارت بودند از: ۱ تا ۳– هر یک از فرمولاسیون های مایع، میکروکپسول سوسپانسیون و میکروکپسول پودر با روش افزودن به خاک، ۴ تا ۶– هر یک از فرمولاسیون های مذکور با روش غوطه‌ورسازی ریشه نشاء، ۷– قارچ‌کش تالارومین با روش افزودن به خاک، ۸– شاهد (بدون کاربرد فرمولاسیون و قارچ‌کش). ارزیابی تیمارها با تعیین درصد وقوع و درصد شدت بیماری پژمردگی فوزاریومی صورت پذیرفت. نتایج نشان داد که میکروکپسول پودر با روش آغشته‌سازی نشاء و فرمولاسیون مایع با روش افزودن به خاک به ترتیب با کاهش درصد شدت بیماری به میزان ۹۱/۶ و ۶۸/۴ درصد نسبت به شاهد از موثرترین تیمارها بوده‌اند. با توجه به نتایج به دست آمده، روش تولید و به کارگیری هر یک از فرمولاسیون‌های میکروکپسول و مایع *Talaromyces flavus* به عنوان دانش فنی تلقی شده و می‌توان نسبت به انجام مراحل تجاری‌سازی آن‌ها اقدام نمود.

واژه‌های کلیدی: پژمردگی فوزاریومی، گوجه‌فرنگی، فرمولاسیون زیستی، *Talaromyces flavus*

مقدمه

در ایران، بر اساس آخرین آمار ارائه شده در وزارت جهاد کشاورزی، بیش‌ترین میزان تولید در میان محصولات گلخانه‌ای به ترتیب به خیار گلخانه‌ای و گوجه‌فرنگی تعلق داشته است. سطح زیر کشت خیار، ۶۴۳۲/۷۰ هکتار با تولید ۱۶۳۹۱۷۲ تن و عملکرد ۲۵۴/۸۱ تن در هکتار و سطح زیر کشت گوجه‌فرنگی، ۷۱۳/۸۰ هکتار با تولید ۱۹۲۷۷۵/۳۰ تن و عملکرد ۲۷۰/۰۶ تن در هکتار گزارش شده است (Vakili Bastam *et al*., 2023).

از بیماری‌های قارچی خاکزاد مهم محصولات گلخانه‌ای مذکور در مناطق عمده کشت آن‌ها، پژمردگی فوزاریومی و بوته‌میری پیتیومی معرفی شده که سالانه خسارت ناشی از این بیماری‌ها، قابل ملاحظه بوده است. از روش‌های قابل توسعه و موثر برای مدیریت این گونه بیماری‌های خاکزاد گیاهان، کنترل زیستی با استفاده از فرآورده‌های در بردارنده عوامل مفید مهارگر قارچی و باکتریایی بوده که اخیرا در داخل و خارج از کشور برای تجاری‌سازی و تولید انبوه‌شان، توسعه و بهینه‌سازی فرمولاسیون‌های آن‌ها نیز از اهمیت بسزایی برخوردار است. از فن‌آوری‌های جدید به کار رفته در دنیا برای تولید فرمولاسیون‌های زیستی می‌توان به کاربرد فن‌آوری فرمانتاسیون با دستگاه فرمانتور برای تولید فرمولاسیون مایع و فن‌آوریمیکرو برای تولید فرمولاسیون میکروکپسول (فرمولاسیون دربردارنده اسپورهای قارچ مهارگر در اندازه میکرو با پوشش شبکه‌ای ذرات میکرو) اشاره داشت (Negahban *et al*., 2011).

نتایج تحقیقات پیشین انجام یافته در ایران در زمینه تولید میکروکپسول‌های دربردارنده *T. flavus*، بررسی اسپورزایی و پایداری آن‌ها و تعیین کارآیی شان در کنترل بیماری پژمردگی ورتیسلیومی پنبه، پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی و خیار گلخانه‌ای در شرایط گلخانه نشان داد که میکروکپسول‌های مذکور به صورت معنی‌داری در کاهش بیماری‌های فوق مؤثر بوده‌اند (Naraghi *et al*., 2018a and b; Naraghi and Negahban, 2019a and b).

کاربرد قارچ *T. flavus* در مزارع به صورت تکثیر یافته در حالت فرمانتاسیون جامد (Solid Fermentation) روی بقایای گیاهی و یا مخلوط آن‌ها با خاک پیت موجب کاهش میزان وقوع بیماری و افزایش عملکرد در محصولات فوق گردید؛ به طوریکه در گیاه پنبه، ۵۰٪ کاهش درصد بیماری پژمردگی ورتیسلیومی، ۳۷٪ کاهش درصد بیماری مرگ گیاهچه و ۳۰٪ افزایش عملکرد؛ در گیاه سیب‌زمینی، ۴۰٪ کاهش درصد بیماری و ۱۷٪ افزایش عملکرد (Naraghi *et al*., 2014b)؛ در گیاه چغندرقند، ۹۳٪ افزایش تعداد گیاهچه سالم و ۵۰٪ افزایش عملکرد (Naraghi *et al*., 2014a)؛ در گیاه گوجه‌فرنگی، ۲۷٪ کاهش درصد شدت بیماری و ۲۳٪ افزایش عملکرد (Farhang Niya *et al*., 2015) و در گیاه خیار گلخانه‌ای، ۳۰٪ کاهش درصد شدت بیماری و ۷٪ افزایش عملکرد حاصل شد (Naraghi *et al*., 2017). از آن جا که در تولید انبوه و تجاری‌سازی عوامل بیولوژیک، مسئله بازاریابی و جلب نظر مصرف کنندگان مربوطه امر مهمی محسوب می‌شود (Pereira *et al*., 2009)؛ در حال حاضر، امر تجاری‌سازی عامل بیولوژیک *T. flavus* و تولید بیوفرمولاسیون‌های مختلف آن از جمله میکروکپسول‌ها ضروری است. لازم به ذکر است که در تحقیق حاضر، در تهیه میکروکپسول *T. flavus* از فن‌آوری میکرو استفاده شده و کلیه ذرات به استثنای قارچ، دارای اندازه میکرو هستند.

دردهه‌های اخیر زیست‌فناوری میکرو در زمینه‌های مختلف شیمیایی داروسازی، پزشکی و آفت‌کش‌های شیمیایی کشاورزی گسترش چشمگیری داشته است. موضوعی که سبب ضرورت تحقیق و توسعه در زمینه آفت‌کش‌های میکرو می شود، پدیده مقاومت آفات نسبت به آفت‌کش‌ها است؛ لذا معرفی آفت‌کش‌های میکرو به پژوهشگران موجب رونق تحقیق و توسعه در این زمینه نسبتا جدید می‌شود. با توجه به مشکلات زیست محیطی و هزینه‌های ناشی از مصرف مقادیر زیاد آفت‌کش‌های معمولی و نیز مشکلات ناشی از مقاومت آفات به این آفت‌کش‌ها تحقیق و توسعه در زمینه آفت‌کش‌های میکرو به عنوان یک ضرورت می تواند مطرح گردد. استفاده از

پلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر در تولید میکرو امولسیون‌ها و میکرو کپسول‌هایی با کارایی بالا و ساخته شده از مواد طبیعی و زیست تجزیه‌پذیر می‌تواند گامی مؤثر در این زمینه باشد. به منظور افزایش کارآمدی و کاهش خطرات زیست‌محیطی به نظر می‌رسد، فرمولاسیون کپسوله‌کردن بهترین گزینه باشد (Maji *et al*., 2014). لذا تولید بیو فرمولاسیون به فرم میکرو باعث ایجاد توانایی کنترل‌شده، افزایش قدرت و پایداری و محافظت از ماده موثره در شرایط نامساعد محیطی نظیر نور و رطوبت می‌شود. همچنین کاربرد فرمولاسیون میکرو کپسوله‌شده به پایین آوردن دز مصرفی آفت‌کش و صرفه اقتصادی و حفاظت از محیط زیست و کاهش خطرات محیط زیستی آن و همچنین صادرات بهتر محصول کمک شایان توجهی می‌کند (Martin *et al*., 2010). میکروذرات دارای سطح به حجم بیشتری نسبت به میکرو ذرات بوده که سبب افزایش سطح فعال و رهایش کنترل شده آ نها می شود. به علاوه، مزیت دیگر میکرومتری بودن ذرات این است که این ترکیبات باعث تحریک سیستم ایمنی بدن انسان و جانوران نشده و به سرعت از بدن خارج می شوند (Guan *et al*., 2008).

فناوری میکروکپسول که حاوی مولکول‌های قارچ‌کش یا آفت کش با اندازه در مقیاس میکرو هستند، یکی از روش های تولید فرمولاسیون آفت‌کش بوده که باعث حذف آسان‌تر و سریع تر آفت می‌شود (Guan *et al*., 2008). امولسیون، سامانه‌ای ناهمگن و متشکل از دو مایع غیرقابل امتزاج است که روغن در آب به صورت قطره هایی پراکنده شده است. امولسیون‌هایی با اندازه قطرات در محدوده ۲۰ تا ۲۰۰ میکرومتر را میکروامولسیون می‌نامند (Ostertag *et al*., 2012). ساختار و ویژگی های منحصر به فرد میکروامولسیون‌ها در مقایسه با امولسیون‌های معمولی مزیت‌هایی را برای کاربرد آن‌ها در بسیاری از صنایع ایجاد کرده است. از کاربردهای سامانه‌های میکروامولسیونی در صنایع می‌توان به نقش آن‌ها در انکپسوله کردن و کنترل رهایش ترکیبات فراسودمند مانند انواع اسانس‌ها، ویتامین‌ها و غیره اشاره کرد (Negahban *et al*., 2011; Kah & Hofmann, 2014; Naraghi *et al*., 2018 a and b).

با اجرای این تحقیق، کارآیی میکروکپسول *T. flavus* در دو حالت سوسپانسیون و پودر و فرمولاسیون مایع *T. flavus* با هر یک از روش‌های کاربرد (افزودن به خاک و آغشته‌سازی ریشه نشاء برای گوجه‌فرنگی در گلخانه تجاری) از لحاظ کاهش وقوع بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی ارزیابی شد. همچنین، مقایسهٔ کارآیی این گونه فرآورده‌های بیولوژیک بر مبنای بستر میکروذرات و بستر محیط کشت مایع با قارچ‌کش تالارومین بر پایه بستر سبوس برنج از لحاظ مذکور انجام گرفت. از نوآوری‌های پژوهش حاضر، می‌توان به میزان مصرف کم تر از چنین فرمولاسیون‌هایی بر پایه کاربرد فرمانتور و فناوری نانو نسبت به فرمولاسیون قبلی بر پایه بستر سبوس برنج (تالارومین) اشاره داشت. به طوری که بر اساس تحقیقات پیشین (Naraghi *et al*., 2017)، میزان کاربرد تالارومین در روش افزایش به خاک ۲۵ کیلوگرم در هکتار برای مدیریت پژمردگی فوزاریومی محصولات گلخانه‌ای نظیر خیارو گوجه‌فرنگی گزارش شده؛ در حالیکه، نتایج این پژوهش مشخص نمود که با کاربرد دو لیتر از هر یک از فرمولاسیون‌های مایع، میکروکپسول سوسپانسیون و میکروکپسول پودر *T. flavus* به ترتیب با غلظت‌های ۵، ۵ و ۰/۵ در هزار برای یک هکتار، کاهش معنی‌دار درصد شدت بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی موجب شده است.

روش بررسی

تهیه فرمولاسیون مایع *T. flavus* با کاربرد فرمانتور

در این مرحله، بر اساس نتایج تحقیق پیشین (Naraghi *et al*., 2020) از میان هشت تیمار مطالعه شده برای تولید فرمولاسیون مایع از مؤثرترین آن‌ها از لحاظ افزایش اسپورزایی، پایداری و وزن توده میسلیومی و کاهش میزان آلودگی (تیمار شماره ۸ مربوط به دمای ۲۵ درجه سلسیوس، محیط کشت Potato Dextrose Broth و تثبیت‌کننده دی سیکلوسرین) استفاده شد. برای تهیه فرمولاسیون مایع *T. flavus* از فرمانتور چهار لیتری موجود در بخش تحقیقات کنترل زیستی مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور استفاده

گردید. بدین منظور، ابتدا ظروف تنگ مانند پروپیلنی قابل اتوکلاو با حجم چهار لیتر و قطر دهانه چهار سانتی متر آماده شد. سپس، نسبت به تهیه دو بخش محیط کشت شامل محیط کشت شروع کننده (Starter Medium) و محیط کشت فرمنتاسیون (Fermentation Medium) اقدام شد. محیط کشت شروع کننده همان محیطی بود که قارچ آنتاگونیست به آن مایه‌زنی شد و در نهایت این محیط برای مایه کوبی به محیط کشت فرمنتاسیون مورد استفاده قرار گرفت (Mascarin *et al*., 2015).

بر اساس روش مذکور، برای حجم چهار لیتر، میزان محیط کشت شروع کننده، چهارصد میلی‌لیتر و میزان محیط کشت فرمنتاسیون سه لیتر منظور شد. برای هر دو نوع محیط کشت از یک نوع محیط کشت‌های مایع استفاده شده و برای هر لیتر آن ۳۰ گرم ملاس و پنج گرم مخمر استفاده گردید. برای تهیه محیط کشت شروع کننده، نیمی از حجم مورد نظر (دویست میلی‌لیتر از چهارصد میلی‌لیتر) با قارچ آنتاگونیست در غلظتی معادل $۱۰^{۹}$ واحد پرگنه ساز در میلی‌لیتر مایه‌زنی شد؛ برای رسیدن به غلظت مذکور، ابتدا سوسپانسیونی از محیط کشت با غلظت $۱۰^{۱۱}\times ۴$ در میلی‌لیتر تهیه گردید، و یک میلی‌لیتر از آن با محیط کشت به حجم ۲۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد و پس از استقرار روی دستگاه تکان‌دهنده (shaker) به مدت پنج روز، برای تهیه محیط کشت شروع کننده با حجم چهارصد میلی‌لیتر به این حجم، ۲۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت افزوده گردید. در نهایت، محیط کشت شروع کننده با حجم چهار صد میلی‌لیتر به محیط کشت فرمنتاسیون با حجم سه لیتر مایه‌زنی شد و برای تولید بیوفرمولاسیون مایع با حجم چهار لیتر در دستگاه فرمانتور مورد استفاده قرار گرفت (Mascarin *et al*., 2015). نمایی از فرمانتور و فرمولاسیون مایع به دست آمده در شکل ۱ نشان داده شده است.

برای میزان سرعت دوران و زمان مناسب فرمانتور از مناسب‌ترین زمان و سرعت دوران از لحاظ بیش‌ترین تولید تعداد اسپور در میلی‌لیتر (CFU) مطابق نتایج به دست آمده از مرحله مقدماتی (Naraghi *et al*., 2020) استفاده شد. pH یا اسیدیته برای محیط فرمانتاسیون بر اساس مطلوب‌ترین pH برای تولید انبوه *T. flavus*، معادل ۸ در نظر گرفته شد. همچنین، از ترکیبات افزودنی ضد کف به میزان ۲۰ میلی‌لیتر برای حجم چهار لیتر نیز استفاده گردید.

شکل ۱. نمایی از فرمانتور (راست) و فرمولاسیون مایع به دست آمده (چپ)

Fig. 1. A view of the fermenter (right) and the obtained liquid formulation (left)

بهینه‌سازی فرمولاسیون مایع *T. flavus*

در این مرحله، فرمولاسیون به دست آمده به شش بخش مختلف تقسیم شد و مخلوط‌سازی آن‌ها با مکمل‌های افزودنی مختلف (امولسیون‌کننده‌ها یا تعلیق‌کننده‌ها شامل Triton X 100 و Tween 20 و چسباننده‌ها شامل کربوکسی متیل سلولز و ملاس نیشکر) مطابق روش انجلکس (Engelelkes *et al*., 1997) صورت گرفت. شش بخش مختلف عبارت بودند از: ۱– فرمولاسیون همراه با Triton X 100 و کربوکسی متیل سلولز، ۲– فرمولاسیون همراه با Triton X 100 و ملاس نیشکر، ۳– فرمولاسیون همراه با Tween 20 و کربوکسی متیل سلولز، ۴– فرمولاسیون همراه با Tween 20 و ملاس نیشکر، ۵– ترکیب Triton X 100، Tween 20، کربوکسی متیل سلولز و ملاس نیشکر، ۶– فرمولاسیون بدون مکمل افزودنی.

در مرحله بعد درصد تعلیق هر یک از ترکیبات مختلف امولسیون کننده–چسباننده در فرمولاسیون مایع مطابق روش مشخص شد وترکیب امولسیون کننده– چسباننده با بیش‌ترین درصد تعلیق به عنوان مکمل افزودنی برای بهینه‌سازی فرمولاسیون مایع انتخاب شد. درصد تعلیق یا

درصد سوسپانسیون شوندگی فرمولاسیون‌ها مطابق روش CIPAC (2007) اندازه‌گیری شد. بدین صورت که ۰/۷۰۰گرم از هر فرمولاسیون به ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه و ۶۰ بار تکان داده شد. سپس، به مدت ۳۰ دقیقه در جای ساکن قرار داده شد. از قسمت بالایی مخلوط، ۲۲۵ میلی‌لیتر برداشته و باقیمانده پس از خشک کردن در آون، توزین گردید.

تعیین درصد تعلیق برای فرمولاسیون‌های مایع با ترکیب مختلف امولسیون‌کننده- چسباننده

مراحل استحصال پودر خشک از ترکیبات سورفکتانت- چسباننده در حالت‌های مخلف مطابق توضیح داده شده در بخش روش تحقیق به شرح ذیل بود:

-به حجم رساندن هفت دهم گرم از هر ترکیب با ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر در لوله آزمایش

-۶۰ بار تکان دادن لوله آزمایش به صورت حرکات متوالی عمودی و افقی

-قرارگیری لوله‌های آزمایش به حالت ساکن به مدت ۳۰ دقیقه

- حفظ ۲۵ میلی‌لیتر از بخش انتهایی لوله آزمایش و حذف لایه بالایی

- انتقال ۲۵ میلی‌لیتر مربوط به هر لوله آزمایش از ترکیبات مختلف به تشتک‌های پتری به صورت جداگانه

- قرارگیری در دمای ۴۰ درجه سلسیوس به مدت دو شب

- بررسی تشتک های پتری از لحاظ مشاهده یا عدم مشاهده پودر خشک مربوط به ترکیبات مختلف امولسیون کننده-چسباننده

- تفاضل وزن تشک پتری قبل از انتقال سوسپانسیون از وزن تشتک پتری بعد از انتقال سوسپانسیون به منظور محاسبه وزن پودر خشک (میزان تعلیق نشده از میزان هفت دهم گرم ترکیب امولسیون کننده-چسباننده در سوسپانسیون‌های تهیه شده) (جدول ۱).

برای محاسبه درصد تعلیق در هر یک از حالت های مختلف ترکیب امولسیون کننده- چسباننده، میزان تعلیق (تفاضل میزان تعلیق نشده یا همان وزن پودر خشک از میزان کل ۰/۷۰۰ گرم فرمولاسیون دربردارنده ترکیب امولسیون کننده- چسباننده در سوسپانسیون‌های تهیه شده) برای هر یک از حالت‌های متفاوت ترکیب امولسیون کننده- چسباننده برآورد گردید و با منظور نمودن تناسب و تعیین ۱۰۰ درصد تعلیق برای میزان کل ۰/۷۰۰ گرم، درصد تعلیق هر یک از ترکیبات امولسیون کننده- چسباننده مشخص شد (جدول ۲).

تهیه میکروکپسول *T. flavus* در شکل سوسپانسیون

تولید میکروکپسول، تلفیقی از روش پلیمریزاسیون و شبکه‌ای شدن است که بر اساس روش نگهبان و همکاران (Negahban *et al*., 2011) و با ایجاد تغییراتی مطابق و متناسب با شرایط رشد قارچ (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 به همراه مخلوطی از قارچ آنتاگونیست *T. flavus* بوده که در فاز آبی متشکل از مخلوط پلیمرهای آب دوست شامل پلی اوره فرمالدهید، نشاسته و کیتوزان، اضافه شد. سپس، به مجموع دو فاز، کرانس لینکرهایی چون کلرید کلسیم و همچنین سورفاکتانت‌ها و مواد همراه و روغن‌های اسید چرب افزوده شد و یکنواخت‌سازی در دمای ۳۵ درجه سلسیوس هموژنایزر با ده هزار دور در دقیقه انجام شد. در نهایت، ذرات پلیمر شبکه‌ای به صورت کپسول در اطراف اسپورهای قارچ آنتاگونیست *T. flavus* تشکیل شد. نمایی از میکروکپسول *T. flavus* به صورت سوسپانسیون در شکل ۲ آورده شده است.

تهیه میکروکپسول *T. flavus* در شکل پودر

در میکروکپسول در شکل پودر، سوسپانسیون حاوی اسپورهای قارچ زیستی 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 قرارگیری در دستگاه تکان دهنده (shaker) با۱۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس کاملا به پودر تبدیل شد

(Negahban *et al.*, 2011). نمایی از میکروکپسول *T. flavus* به صورت پودر در شکل ۲ آورده شده است.

شکل ۲. نمایی از فرمولاسیون میکروکپسول *Talaromyces flavus* در شکل سوسپانسیون (راست) و پودر (چپ)

Fig. 2. A view of *Talaromyces flavus* microcapsule formulation in suspension (right) and powder (left) form.

بهینه‌سازی فرمولاسیون‌های میکروکپسول *T. flavus* در دو شکل سوسپانسیون و پودر تعیین مناسب ترین پلیمر و سورفکتانت از لحاظ قابلیت حلالیت در اسیدیته های مختلف برای تولید میکروکپسول های سوسپانسیون و پودر *T. flavus*

به منظور بهینه‌سازی فرمولاسیون‌های میکروکپسول، بر اساس منابع علمی موجود، انواع پلیمرها و سورفاکتانت (از اجزای سازنده فرمولاسیون‌های میکروکپسول) از لحاظ قابلیت حلالیت در اسیدیته‌های مختلف بررسی شدند (Marivone *et al.*, 2013; Kumari *et al.*, 2020) و در نهایت، مطلوب‌ترین پلیمر و سورفاکتانت از لحاظ قابلیت در اسیدیته‌های مختلف برای تهیه فرمولاسیون میکروکپسول در دو شکل سوسپانسیون و پودر به کار برده شد. پلیمرهای مورد بررسی عبارت بودند از: کیتوزان، آلژینات، متیل متاکریلات، لیگنین، پلی اتیلن گلیکول، کاشوگام (cashew gum)، پلی وینیل پیرولیدون، نشاسته بر پایه پلی اتیلن، وینیل استات و گوارگام (Guar gum).

سورفکتانت‌های مورد بررسی عبارتند از: الکیل سولفات، تگزاپون، گلوکونات، سولفونات، نمک‌های آمونیوم، پلی اکسی اتیلن (توئین ها)، آمفواستات، بتادین، آمینو اسید، سوربیتول، اتوکسیلات، الکوکسیلات، سورفاکتانت‌های با پایه الکلی و گیاهی (مریستیل الکل)، سولفوساکسینات سدیم و لیگنوسولفات کلسیم.

با استفاده از منابع علمی موجود، قابلیت حلالیت پلیمرها و سورفکتانت در اسیدیته‌های مختلف تعیین شد و بر این اساس، پلیمرها و سورفکتانت‌های با قابلیت حلالیت در بازهٔ بیشتری از محدودهٔ اسیدیته مشخص شدند. در ادامه، برای انتخاب نهایی پلیمرها و سورفکتانت‌های قابل استفاده در میکروکپسول‌های سوسپانسیون و پودر، از نتایج تحقیقات پیشین در راستای پلیمرها و سورفکتانت‌های معرفی شده در ساخت میکروکپسول های سوسپانسیون و پودر (Goel *et al.*, 2019; Qureshi *et al.*, 2022) استفاده شد.

بررسی کارآیی فرآورده‌های بیولوژیک میکروکپسول و فرمولاسیون مایع *T. flavus* در کنترل بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی در گلخانه‌های تجاری

بررسی‌های مربوط به گلخانه‌های تجاری، طی یک سال در گلخانه‌های گوجه‌فرنگی دو منطقه یزد و اصفهان با سابقه آلودگی به بیماری پژمردگی فوزاریومی انجام شد. هر آزمایش در قالب طرح آماری بلوک‌های کامل تصادفی با هشت تیمار در چهار تکرار صورت پذیرفت. تیمارها در هر یک از آزمایشات مربوط به گلخانه تجاری، عبارتند از: ۱ تا ۳– دز پنج در هزار از هر یک از فرمولاسیون های مایع، میکروکپسول در شکل سوسپانسیون و میکروکپسول در شکل پودر با روش افزودن به خاک، ۴ تا ۶– هر یک از فرمولاسیون‌های مایع، میکروکپسول در شکل سوسپانسیون و میکروکپسول در شکل پودر با غلظت ده به توان هفت واحد پرگنه‌ساز در یک گرم از فرمولاسیون برای روش غوطه‌ورسازی ریشه نشاء گوجه‌فرنگی، ۷– قارچ‌کش تالارومین با روش افزودن به خاک، ۸– شاهد (بدون کاربرد فرمولاسیون و قارچ کش). ارزیابی تیمارها به صورت تعیین درصد وقوع و درصد شدت بیماری پژمردگی فوزاریومی انجام گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌های آماری و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن توسط برنامه نرم‌افزاری MS TAT C صورت پذیرفت. برای

تیمار افزودن به خاک برای هر یک از فرمولاسیون‌های میکروکپسول و مایع *T. flavus*، بر اساس روش کاربرد کودهای زیستی مایع، سطح خاک با سوسپانسیون تهیه شده از هر یک از فرمولاسیون‌ها، بر حسب تیمار پوشش داده شد (Dehne, 2011). تیماردهی نیز هم زمان با کاشت نشاء گوجه‌فرنگی اجرا گردید. برای کاربرد بیوفرمولاسیون مایع و میکروفرمولاسیون‌های *T. flavus* در تیمار غوطه‌ورسازی ریشه نشاء، ریشه نشاء گوجه‌فرنگی بر حسب تیمار با سوسپانسیون هر فرمولاسیون در غلظتی معادل ده به توان هفت واحد پرگنه ساز در گرم به مدت ده تا بیست دقیقه غوطه‌ور شد.

ارزیابی تیمارها، چهار ماه پس از کاشت به صورت تعیین درصد شدت بیماری صورت پذیرفت. برای تعیین درصد شدت بیماری براساس روش لیو و همکاران (Liu *et al.*, 1995)، ابتدا میزان وقوع بیماری از طریق مشاهده علائم آن با استفاده از یک مقیاس شامل شش درجه به شرح ذیل مشخص گردید:

صفر= بدون علائم بیماری

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

۲= کلروز برگی و پژمردگی بوته از ۲۵ تا ۵۰ درصد

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

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

۵= بوته مرده یا کاملا از بین رفته

سپس، درصد شدت بیماری برای هر تیمار مطابق فرمول ذکر شده برای آزمون اثبات بیماری‌زایی به شرح ذیل محاسبه شد:

درصد شدت بیماری= $\Sigma nivi/NV\times 100$

n: تعداد بوته‌های مربوط به هر درجه؛ v: شماره هر درجه؛ N: تعداد کل بوته ها؛ V: شماره بیش ترین درجه آلودگی (۵)

برای انجام این بررسی‌ها از بذر رقم آلمانی گوجه‌فرنگی با نام SV 4129 SH مربوط به شرکت سمینیس (Seminis) زیرمجموعه‌ای از شرکت بایر، استفاده گردید.

نتایج و بحث

بهینه‌سازی فرمولاسیون مایع *T. flavus*

در این مرحله بر اساس محاسبهٔ درصد تعلیق برای فرمولاسیون‌های مایع دربردارنده حالت‌های مختلف ازترکیب امولسیون‌کننده (Triton X–100 و Tween 20) و چسباننده (کربوکسی متیل سلولز و ملاس چغندرقند)، مناسب‌ترین ترکیب امولسیون کننده– چسباننده برای کاربرد در تهیهٔ فرمولاسیون مایع *T. flavus* مشخص شد. با توجه به روش برآورد درصد تعلیق در بخش روش تحقیق، ابتدا وزن پودرخشک فرمولاسیون‌های مایع دربردارنده حالت‌های مختلف از ترکیب امولسیون کننده– چسباننده پس از مراحل تهیهٔ سوسپانسیون از هر یک از فرمولاسیون‌ها و استحصال پودر خشک از سوسپانسیون تهیه شده، برای هر فرمولاسیون مشخص شد(جدول ۱).

جدول ۱– وزن پودرخشک (میزان تعلیق نشده) به دست آمده از فرمولاسیون‌های مایع در بردارنده حالت‌های متفاوت از ترکیب امولسیون کننده– چسباننده برای تعیین درصد تعلیق برای فرمولاسیون‌های مایع

Table 1. The weight of the glitter powder (unsuspended amount) obtained from liquid formulations in different states of the emulsifier–binder combination to determine the percentage of suspension for liquid formulations

Different modes of emulsifier–adhesive combination in liquid formulations	Weight of dry powder (unsuspended amount) in liquid formulation (g)
Triton X–100– Carboxymethyl cellulose	0.01
Triton X–100– Sugarcane molasses	0.01
Tween 20– Carboxymethyl cellulose	0
Tween 20– Sugarcane molasses	0.01
(Triton X–100+ Tween 20)– (Carboxymethyl cellulose+ Sugarcane molasses)	0.04
Without emulsifier–adhesive combination	0.13

جدول ۲– میزان درصد تعلیق در فرمولاسیون‌های مایع در بردارنده حالت‌های مختلف از ترکیب امولسیون‌کننده– چسباننده از طریق محاسبه میزان تعلیق

Table 2. The percentage of suspension in liquid formulations containing different states of the emulsifier–adhesive combination by calculating the amount of suspension

Different modes of emulsifier–adhesive combination in liquid formulations	The difference of the amount of unsuspended or dry powder weight from the total amount of seven tenths of grams of the formulation containing the emulsifier–adhesive compound (g)	Suspension percentage (%)
Triton X–100– Carboxymethyl cellulose	0.70–0.01=0.69	98.58
Triton X–100– Sugarcane molasses	0.70–0.01=0.69	98.58
Tween 20– Carboxymethyl cellulose*	0.70–0=0.70	100
Tween 20– Sugarcane molasses	0.70–0.01=0.69	98.58
(Triton X–100+ Tween 20)– (Carboxymethyl cellulose+ Sugarcane molasses)	0.70–0.04=0.66	94.29
Without emulsifier–adhesive combination	0.70–0.12=0.57	81.43

* فرمولاسیون مایع در بردارنده ترکیب Tween 20– کربوکسی متیل سلولز با بیش‌ترین درصد تعلیق (۱۰۰ درصد)

*Liquid formulation containing the combination of Tween 20–carboxymethyl cellulose with the highest suspension percentage (100 %)

بدین ترتیب، بر اساس نتایج به دست آمده مندرج در جدول ۲، بیش‌ترین درصد تعلیق به میزان ۱۰۰٪ برای ترکیب Tween 20 (امولسیون‌کننده)–کربوکسی متیل سلولز (چسباننده) برآورد گردید و این ترکیب برای بهینه‌سازی فرمولاسیون مایع *T. flavus* به کار گرفته شد. تحقیقات پیشین در زمینه تهیه بیوفرمولاسیون‌ها، کارآیی Triton X–100 و Tween 20 را از لحاظ امولسیون‌کنندگی نشان داده (Shen *et al*., 2022)؛ همچنین، در تحقیقی در زمینه کنترل بیماری مرگ گیاهچه چغندرقند با استفاده از بیوفرمولاسیون‌های دربردارنده عامل کنترل زیستی تریکودرما از ملاس نیشکر به عنوان چسباننده برای پوشش‌دهی این فرمولاسیون‌ها روی بذور چغندرقند استفاده شده است (Bardin and Huang, 2003). از طرف دیگر، به کارگیری ترکیب چسباننده کربوکسی متیل سلولز در فرمولاسیون‌های در بردارنده عوامل کنترل زیستی باکتریایی در چسبانندگی این فرمولاسیون‌ها روی بذور شلغم به منظور کنترل بیماری‌های قارچی خاکزاد موفق عمل نموده است (May Chin *et al*., 2021).

بهینه‌سازی فرمولاسیون‌های میکروکپسول *T. flavus* در دو شکل سوسپانسیون و پودر

تعیین مناسب‌ترین پلیمر و سورفکتانت از لحاظ قابلیت حلالیت در اسیدیته‌های مختلف برای تولید میکروکپسول‌های سوسپانسیون و پودر *Talaromyces flavus*

برای تولید میکروکپسول‌های بهینه‌سازی شده، پلیمرها و سورفکتانت‌هایی با قابلیت حلالیت در بازهٔ بیش‌تری از محدودهٔ اسیدیته (اسیدی، خنثی و بازی)، انتخاب شدند (جداول ۳ و ۴).

با مشخص شدن پلیمرها و سورفکتانت‌های با قابلیت حلالیت در بازهٔ بیشتری از محدودهٔ اسیدیته (جدول‌های۳ و ۴)، بر مبنای پلیمرها و سورفکتانت‌های معرفی‌شده در ساخت میکروکپسول‌های سوسپانسیون و پودر (Goel *et al*., 2019; Qureshi *et al*., 2022)، مناسب‌ترین پلیمرها و سورفکتانت‌ها به شرح ذیل در فرآیند تولید میکروکپسول سوسپانسیون و پودر به کار برده شد (جدول ۵).

جدول ۳– بازۀ اسیدیته برای قابلیت حلالیت پلیمرهای قابل استفاده در میکروکپسول‌های سوسپانسیون و پودر

Table 3– Acidity range for the solubility of polymers that can be used in suspension and powder microcapsules

The name of the polymer	Acidity range for solubility	Used reference
chitosan*	pH≤7, pH≥7	Castro and Paulin, 2012
methyl methacrylate	pH>7	Darabi Mahboub *et al*., 2018
lignin	4≤pH≤7	Pylypchuk and Sippunen, 2022
alginate*	pH≤7, pH≥7	Goel *et al*., 2019
polyethylene glycol	pH≤7, pH≥7	Cao *et al*., 2022
cashew gum	6≤pH≤8	Ofridam *et al*., 2021
polyvinylpyrrolidone	pH=7	Sohail *et al*., 2014
guar gum	pH≤7, pH≥7	Sharma *et al*., 2013
starch	5≤pH≤7	Guo *et al*., 2021
vinyl acetate	pH=7	Bailly *et al*., 2012

*پلیمرهای با قابلیت حلالیت در بازۀ بیش‌تری از محدودۀ اسیدیته

* Polymers with the ability to dissolve in a range greater than the range of acidity

جدول ۴– بازۀ اسیدیته برای قابلیت حلالیت سورفکتانت‌های قابل استفاده در میکروکپسول‌های سوسپانسیون و پودر

Table 4. Acidity range for the solubility of surfactants that can be used in suspension and powder microcapsules

The name of the surfactant	Acidity range for solubility	Used reference
alkyl sulfate	5≤pH≤6	Janus *et al*., 2020
texapon (sodium lauryl ether sulfate)	pH=7	Bahr *et al*., 2021
sodium gluconate	6.5≤pH≤7	Pedrosa and Serrano, 2000
sodium sulfonate*	7≤pH≤11	Duc La *et al*., 2018
sodium lignosulfonate*	7≤pH≤11	Ruwold *et al*., 2020
ammonium salt	pH=5.5	Powison *et al*., 2022
myristal alcohol*	2.5≤pH≤9.5	Bhide, 2018
polyoxyethylene	5.5≤pH≤7	Wada *et al*., 2014
amphostat	pH>7	Mijaljica *et al*., 2022
betadine	pH>7	Durani and Leaper, 2008
amino acid	5.5≤pH≤7	Fuchs *et al*., 2006
sorbitol	6≤pH≤9	Valizadeh *et al*., 2004
ethoxylate	pH>7	Gholipour Peyvandi, 2019
alkoxylate	3≤pH≤5	Zajkoska *et al*., 2018

*سورفکتانت‌های با قابلیت حلالیت در بازۀ بیش‌تری از محدودۀ اسیدیته

*Surfactants with the ability to dissolve in a range greater than the range of acidity

جدول ۵– مناسب‌ترین پلیمر وسورفکتانت انتخاب‌شده از میان پلیمرها و سورفکتانت‌های رایج برای تهیهٔ میکروکپسول‌های سوسپانسیون و پودر

Table 5. The most suitable polymer and surfactant selected from among common polymers and surfactants for the preparation of suspension and powder microcapsules

Microcapsule type	The most suitable polymer	A scientific source indicating the common use of polymer	The most suitable surfactant	A scientific source indicating the common use of surfactant
suspension	alginate–chitosan	–Goel *et al*., 2019 Zho *et al*., 2023	myristal alcohol (surfactant with alcohol base)	Modi and Shah, 2015
powder	guar gum	Kaur *et al*., 2015	Calcium lignosulfate Sodium sulfosuccinate	Feizi Mohazzab *et al*., –2020 Pedone *et al*., 2005

بررسی کارآیی فرمولاسیون‌های مختلف *T. flavus* در کنترل بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی در گلخانه تجاری یزد

ارزیابی درصد وقوع و درصد شدت بیماری

طی سال ۱۴۰۰ مربوط به بررسی در گلخانه تجاری منطقه یزد، علائم بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی در هیچ یک از گلخانه‌های تجاری منطقه یزد وجود نداشت (شکل ۳). طی سال‌های اجرای پروژه در این گونه گلخانه‌ها بیماری ویروسی پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی، Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) با ناقل سفید بالک (*Trialeurodes vaporariorum* Westwood) مشاهده شد. به‌دلیل تجاری‌بودن گلخانه و عدم آلودگی آن به بیماری پژمردگی فوزاریومی طی سال‌های مربوط به اجرای پروژه، امکان آلوده‌سازی مصنوعی نیز میسر نبود. نمایی از وقوع علائم بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی در گلخانه غیر تجاری آلوده به این بیماری نشان داده شده است (شکل ۴).

شکل ۳. عدم مشاهده بیماری پژمردگی فوزاریومی در گلخانه تجاری گوجه‌فرنگی منطقه یزد

Fig. 3. Absence of fusarium wilt disease in commercial tomato greenhouse in Yazd region

شکل ۴. علائم بیماری پژمردگی فوزاریومی در گلخانه غیر تجاری گوجه‌فرنگی

Fig. 4. Occurrence of Fusarium wilt disease symptoms in non–commercial tomato greenhouse

علت عدم مشاهده بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی را در گلخانه‌های تجاری منطقه یزد، چنین می‌توان تفسیر نمود که طی سال‌های اجرای پروژه، دما و رطوبت در این گلخانه‌ها بسیار کنترل شده بوده است؛ دمای تنظیم شده در این گلخانه‌ها برای میوه‌دهی در بازه‌های ۱۸ تا ۲۴ درجه سلسیوس و میزان رطوبت در محدودهٔ ۴۵ تا حداکثر ۷۰ درصد است. از طرف دیگر، زمان مشاهده علائم بیماری پژمردگی فوزاریومی نیز در زمان گلدهی و میوه‌دهی (سه تا چهار ماه پس از کاشت) گزارش شده (Feng *et al.*, 2022)؛ در حالی‌که دو عامل مهم برای رشد و فعالیت این عامل بیماری خارج از محدوده‌های تنظیم شده در این گلخانه‌ها بوده است.

بر اساس منابع علمی موجود، دمای مطلوب برای رشد فوزاریوم ، ۲۸ تا ۳۲ درجه سلسیوس (خارج از محدوده تنظیم شده در گلخانه: ۱۸ تا ۲۴ درجه سلسیوس) بود و میزان مطلوب رطوبت برای تکثیر این عامل بیماری، ۱۵ تا ۳۵ درصد (خارج از محدوده تنظیم شده در گلخانه: ۴۵ تا ۷۰ درصد) گزارش شده است (Oritsejafor, 1987)، به عبارتی در آب و هوای گرم و خشک، عامل مهم در فعالیت این قارچ و بروز علائم بیماری منتج از آن است. بنابراین، دما و رطوبت تنظیم شده در این گلخانه‌ها برای رشد و تکثیر فوزاریوم مساعد نبوده و موجب جلوگیری از وقوع بیماری شده است.

بررسی کارآیی فرمولاسیون‌های مختلف *T. flavus* در کنترل بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی در گلخانه تجاری اصفهان

در گلخانه تجاری اصفهان، تهیهٔ نشاها در اواسط اسفند ماه شروع شد و در حدود پنج تا شش هفتگی نشاها (اوایل اردیبهشت)، انتقال آنها به زمین صورت گرفت. علائم بیماری در یک ماه و نیم تا دو ماه پس از انتقال، آشکار نشد. بعد از دو تا سه ماه، علائم پژمردگی روی بوته‌های گوجه‌فرنگی ظاهر شد و ارزیابی بیماری در این محدوده زمانی صورت گرفت (شکل ۵).

شکل ۵– علائم بیماری پژمردگی فوزاریومی روی بوته‌های گوجه‌فرنگی سه ماه پس از انتقال نشاء به زمین

Fig. 5. Occurrence of fusarium wilt disease symptoms on tomato plants three months after transplanting to the ground

ارزیابی درصد شدت بیماری

آزمایش بررسی تاثیر فرمولاسیون‌های مختلف *T. flavus* روی درصد شدت بیماری در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. نتایج گروهبندی میانگین‌های درصد وقوع بیماری در تیمارهای مختلف نشان داد که میانگین‌های تیمارهای مختلف در چهار گروه آماری واقع شده‌اند (جدول ۶). گروه‌های آماری به ترتیب اولویت از لحاظ کم‌ترین میزان درصد شدت بیماری عبارت بودند از: ۱) گروه آماری d با تیمارهای میکروکپسول پودر با روش آغشته‌سازی بذر، میکروکپسول پودر با روش افزودن به خاک، میکروکپسول سوسپانسیون با روش آغشته‌سازی بذر و میکروکپسول سوسپانسیون با روش افزودن به خاک، فرمولاسیون مایع با روش افزودن به خاک. ۲) گروه آماری c با تیمارهای میکروکپسول سوسپانسیون با روش آغشته‌سازی بذر، میکروکپسول سوسپانسیون با روش افزودن به خاک، فرمولاسیون مایع با روش افزودن به خاک و فرمولاسیون مایع با روش آغشته‌سازی بذر. ۳) گروه آماری b با تیمار تالارومین. ۴) گروه آماری a با شاهد.

نتایج مندرج در جدول ۶ نشان داد که همه تیمارها نسبت به شاهد دارای کاهش معنی‌دار درصد شدت بیماری بوده‌اند. در میان تیمارها، کاهش معنی‌دار درصد وقوع بیماری نسبت به شاهد، تیمارهای میکروکپسول پودر با روش آغشته‌سازی بذر، میکروکپسول پودر با روش افزودن به خاک، میکروکپسول سوسپانسیون با روش آغشته‌سازی بذر، میکروکپسول سوسپانسیون با روش افزودن به خاک، فرمولاسیون مایع با روش افزودن به خاک، فرمولاسیون مایع با روش آغشته‌سازی بذر و تالارومین به ترتیب بیش‌ترین کاهش معنی‌دار درصد وقوع بیماری را نسبت به شاهد موجب شدند (جدول ۶).

طی برآورد میزان درصد کاهش میانگین درصد شدت بیماری در تیمارهای مختلف نسبت به شاهد مشخص شد که میزان درصدکاهش درصد شدت بیماری در تیمارهای میکروکپسول پودر با روش آغشته‌سازی بذر، میکروکپسول پودر با روش افزودن به خاک، میکروکپسول سوسپانسیون با روش آغشته‌سازی بذر، میکروکپسول سوسپانسیون با روش افزودن به خاک، فرمولاسیون مایع با روش افزودن به خاک، فرمولاسیون مایع با روش آغشته‌سازی بذر و تالارومین به ترتیب به میزان ۹۱/۶، ۸۸/۶، ۷۷/۳، ۷۲/۱، ۶۸/۴، ۶۲/۳ و ۳۳/۲ درصد بوده است (جدول ۷).

در بررسی انجام شده در منطقه اصفهان، کاهش درصد شدت بیماری در تیمارهای دربردارنده فرمولاسیون‌های میکروکپسول و تالارومین با تحقیقات گلخانه‌ای پیشین در زمینه تعیین کارآیی میکروکپسول‌های پودر و سوسپانسیون در کنترل بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی مطابقت داشت (Naraghi *et al*., 2018a). نتایج مشابهی در مزارع پنبه کارکنده و هاشم آباد در زمینه کاربرد فرمولاسیون‌های میکروکپسول برای کنترل بیماری‌های قارچی مهم پنبه منتشر شده است (Naraghi and Razi Nattaj, 2022).

جدول ۶– مقایسه‌ی میانگین درصد شدت بیماری پژمردگی فوزاریومی در تیمارهای مختلف فرمولاسیون‌های *Talaromyces flavus*

Table 6. Comparison of the mean percentage of Fusarium wilt disease severity in different treatments of *Talaromyces flavus* formulations

Treatment	Average percentage of disease severity (%)
T. flavus microcapsule in suspension form as adding to soil	5.91cd
T. flavus microcapsule in suspension form as seed coating	4.81cd
T. flavus microcapsule in powder form as adding to soil	2.41d
T. flavus microcapsule in powder form as seed coating	1.79d
T. flavus liquid formulation as adding to soil	6.70cd
T. flavus liquid formulation as seed coating	7.99c
Talaromin fungicide	14.16b
Control	21.20a

*میان تیمارهای آزمایش با حروف متشابه، اختلاف آماری معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ وجود ندارد.

*Between experimental treatments with similar letters, there is no statistically significant difference at the 1% probability level.

جدول ۷– میزان درصد کاهش درصد شدت بیماری پژمردگی فوزاریومی در تیمارهای مختلف فرمولاسیون‌های *Talaromyces flavus* نسبت به شاهد

Table 7. The percentage of reduction of Fusarium wilt disease severity in different treatments of *Talaromyces flavus* formulations compared to the control

Treatment	The percentage of reduction in the severity of the disease compared to the control (%)
T. flavus microcapsule in suspension form as adding to soil	72.11
T. flavus microcapsule in suspension form as seed coating	77.29
T. flavus microcapsule in powder form as adding to soil	88.62
T. flavus microcapsule in powder form as seed coating	91.55
T. flavus liquid formulation as adding to soil	68.38
T. flavus liquid formulation as seed coating	62.28
Talaromin fungicide	33.21
Control	–

*بیش‌ترین درصد کاهش درصد شدت بیماری در تیمار میکروکپسول پودر *T. flavus* با روش آغشته‌سازی بذر نسبت به شاهد

*The highest percentage of disease severity reduction in *T. flavus* powder microcapsule treatment with seed impregnation method compared to the control

در تحقیق حاضر، کاربرد فرمولاسیون مایع موجب کاهش معنی‌دار وقوع و شدت بیماری و افزایش معنی‌دار عملکرد شده است. در زمینه کاربرد فرمولاسیون مایع *T. flavus*، یک بررسی در زمینه کارآیی این نوع فرمولاسیون روی بیماری مرگ گیاهچه چغندرقند انجام شده و نتایج نشان دهنده افزایش معنی‌دار تعداد گیاهچه‌های سالم در تیمار حاوی این فرمولاسیون در مقایسه با تیمار شاهد بوده است (Naraghi *et al*., 2019a).

در خارج از کشور تاکنون، برای تهیه میکرو قارچ‌کش از جنس قارچ مورد مطالعه در تحقیق حاضر

(Penicillium)، دو گزارش در زمینه‌های پزشکی و کشاورزی وجود داشته است (Priyadarshini *et al*., 2014; Khan & Jameel, 2016). در زمینه پزشکی، برای تهیه میکروقارچ‌کش بر علیه قارچ بیماری‌زای *Candida albicans* از قارچ زنده *Penicillium fellutanum* استفاده شده و در زمینه کشاورزی نیز برای تهیه میکروقارچ‌کش بر علیه برخی عوامل بیماری‌زای گیاهی، عصاره قارچ *Talaromyces flavus* (تلئومورف قارچ *Penicillium dangeardii*) به کار گرفته شده است (Priyadarshini *et al*., 2014; Khan & Jameel, 2016).

نتیجه گیری کلی

برای کنترل بیماری قارچی خاکزاد پژمردگی فوزاریومی در محصول گوجه‌فرنگی در شرایط مزرعه به کارگیری فرمولاسیون‌های مختلف تالارومین، مایع و میکروکپسول با دو روش افزودن به خاک و آغشته‌سازی بذر موجب کاهش معنی‌دار وقوع بیماری در مقایسه با شاهد شده‌اند.

– برای کنترل بیماری قارچی خاکزاد پژمردگی فوزاریومی، به کارگیری فرمولاسیون‌ها با روش افزودن به خاک موثرتر واقع شده است.

– از محدودیت‌های مهم برای کاربرد چنین فرمولاسیون‌هایی برای مدیریت بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی، عدم آشنایی گلخانه‌داران با این گونه ترکیبات است که بایستی نسبت به اجرای این امر در قالب اجرای پروژه های تحقیقی– ترویجی اقدام شود.

سپاسگزاری

نگارندگان بدین وسیله ازآقای دکتر رسول مرزبان، رئیس محترم بخش تحقیقات کنترل بیولوژیک موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور به خاطر همکاری در راه‌اندازی دستگاه فرمانتور به منظور تهیهٔ فرمولاسیون مایع سپاسگزاری می‌نمایند.

References

Bahr, M.N., Angamuthu, M., Leonhardt, S., Campbell, G. & Neau, S.H. 2021. Rapid screening approaches for solubility enhancement, precipation inhibition and dissociation of a crystal drug substance using high throughput experimentation. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 61(1): 1–14.

Bailly, N., Thomas, M. & Klumperman, B. 2012. Poly (N–vinyl pyrolidone)– block–poly (vinyl acetate) as a drug delivery vehicle for hydrophobic drugs. Biomacromolecules, 13(12): 4109–4117.

Bardin, S.D. & Huang, H.C. 2003. Efficacy of stickers for seed treatment with organic matter or microbial agents for the control of damping–off of sugar beet. Plant Pathology Bulletin, 12(1): 19–26.

Bhide, S. 2018. Functionality and role of different fatty alcohols in topical O/W cream formulation. A thesis presented in partial fulfillment of requirements for the degree of master of science in the department of pharmaceutics and drug delivery, The University of Mississippi, 275 Pages.

Cao, N., Zhao, Y., Chen, H., Huang, J., Yu, M., Bao, Y., Wang, D. & Cui, S. 2022. Poly (ethylene glycol) becomes a supa–polyelectrolyte by capturing hydronium ions in water. Macromolecules, 55(11): 4656–4664.

Castro, S.P.M. & Paulin, E.G.L. 2012. Is chitosan a new Panacea? Areas of application. In: Karunaratne, D. N., Ed., The complex word of polysaccharides, Intech Open Publishing, 953 pages.

CIPAC Handbook. 2007. Physico–chemical methods for technical and formulated pesticides. Vol. F. Collaborative International Pesticide Analytical Council, Harpenden, U.K.

Darabi Mahboub, M. J., Dubois, J.L., Cavani, F., Rostamizadeh, M. & Patience, G.S. 2018. Catalysis for the synthesis of mathacrylic acid and methyl methacrylate. Chemical Society Reviews, 47(20): 7703–7738.

Dehne, H.W. 2011. Modern fingicides and antifungal compounds VI: Proceefings of the 16th International Reinhardsbrunn Symposium, April 25–29, 2010, Friedrichroda, Germany, DPG Spectrom phytomedizin Publishing, 438 pages.

Duc La, D., Anuradha, A., Kaur Hundal, A., Bhosale, S.V., Jones, L.A. & Bhosale, S. V. 2018. pH– Dependent self– assembly of water– soluble sulfonate– tetraphenylethylene with aggregation– induced emission. Supramolecular Chemistry, 30(1): 1–14.

Durani, P. & Leaper, D. 2008. Povidone–iodine: Use in hand disinfection, skin preparation and antiseptic irrigation. Internation Wound Journal, 5(3): 376–387.

Farhang Niya, S., Naraghi, L., Ommati, F. & Pirnia, M. 2015. Evaluation of the efficacy of the biological compound affected by Talaromyces flavus in controlling tomato Fusarium wilt disease in the field conditions. International Journal of Agricultural Science and Research, 5(2): 153–164.

Feizi Mohazzab, B., Jaleh, B., Nasrollahzadeh, M., Khazalpour, S., Sajjadi, M. & Varma, R.J. 2020. Upgraded valorization of biowaste: Laser–assisted synthesis of pd/calcium lignosulfonate nanocomposite for hydrogen storage and evvironmental remediation. ACS (American Chemical Society) Omega, 5(11): 5888–5889.

Feng, H., Gonzales, C., Vaghefi, N., Taylor, P.W.J., Tungsuh, E. & Fuentes, S. 2022. Early detection of *Fusarium oxysporum* infection in processing tomatoes (*solanum lycopersicum*) and pathogen–soil interactions using a low–cost purtable electronic nose and machine learning modeling. Sensors, 22(22): No.8645.

Fuchs, D., Fischer, J., Tumakaka, F. & Sadowski, G. 2006. Solubility of amino acids: Influence of the pH value and the addition of alcoholic consolvents on aqueous solubility. Industrial and Engineering Chemistry Research, 45(19): 6578–6584.

Gholipour Peyvandi, A. 2019. Determination of environmental considerations for the use of dispersant species in different areas of the Caspian Sea. EurAsian Journal of BioSciences, 13(2): 651–662.

Goel, S., Sachdeva, M. & Agarwal, V. 2019. Nanosuspension technology: Recent patents on drug delivery and their characterizations. Recent Patents on Drug Delivery and Formulation, 13(2): 91–104.

Guan, H., Chi, D., Yu, J. & Li, X. 2008. A novel photodegradable insecticide: Preparation characterization and properties evaluation of nano–imidacloprid. Pesticide Biochemistry and Physiology, 83–91.

Guo, B., Hu, X., Wu, Y., Chen, R., Dai, T., Liu, Y., Luo, S. & Liu, C. 2021. Soluble starch/whey protein isolate complex–stabilized high internal phase emulsion: Interaction and stability. Food Hydrocolloides, 111(1): 870–878.

Janus, E., Ossowicz, P., Klebeko, J., Nowak, A., Duchnik, W., Kucharski, L. & Klimowicz, A. 2020. Enhancement of ibuprofen solubility and skin permeation by conjugation with L–valine alkyl esters. RSC (Royal Society of Chemistry) Advances, 10(1): 7570–7584.

Kah, M. & Hofmann, T. 2014. Nanopesticide research: current trends and future priorities. Environment international, 63: 224–235.

Khan, N.T. & Jameel, N. 2016. Antifungal activity of silver nanoparticles produced from fungus, Penicillium fellutanum at different pH. Journal of Microbial and Biochemical Technology, 8(5): 440–443.

Kumari, M., Singh, D.P., Tomar, S. & Solankey, S.S. 2020. Nanopesticides: A new paradigm in crop protection. Plant Archives, 120(1): 104–109.

Liu, L., Kloepper, J.W. & Tuzun, S. 1995. Induction of systemic resistance in cucumber against Fusarium wilt by plant growth promoting rhizobacteria. Phytopathology, 85: 695– 698.

Maji, R., Dey, N., Satapathy, B., Mukherjee, B. & Mondal, S. 2014. Preparation and characterization of Tamoxifen citrate loaded nanoparticles for breast cancer therapy. International journal of nanomedicine, 9: 3107.

Marivone, G., Daniel Aragao Riberio, de S., Vitor Moritz, M., Nivaldo Cabral, K. & Humberto Gracher, R. 2013. Effect of pH variations on zinc oxide nanostructures prepared via solochemical method. Journal of Nanoengineering and Nanomanufacturing, 3(1): 15–18.

Martin, A., Varona, S., Navarrete, A. & Cocero, M. 2010. Encapsulation and co–precipitation processes with supercritical fluids: applications with essential oils. The Open Chemical Engineering Journal, 4(1): 31–41.

Mascarin, G.M., Jackson, M.A., Kobori, N.N., Bahle, R.W. & Junior, I.D. 2015. Liquid culture fermentation for rapid production of desiccation tolerant blastospores of *Beuveria bassiana* and *Isaria fumosorosea* strains. Journal of Invertebrate Pathology, 127(1): 11–20.

Mijaljica, D., Spada, F. & Harrison, L. 2022. Skin cleansing without or with compromise: soaps and syndets. Molecules, 27(6): 2010.

Modi, K. & Shah, M.B. 2015. Pharmacognostic specifications and quantification of oleanolic acid and lupeol in *Mollugo oppositifolia* Linn. Pharmacognosy Journal, 7(2): 83–88.

May Chin, J., Yan Lim, Y. & Yien Ting, A.S. 2021. Biopolymers biopriming of Brassica rapa seeds, a study on coating efficacy, bioagent viability and seed germination. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences, 20(3): 198–207.

Naraghi, L., Naeimi, S. & Marzban, R. 2019a. Application of *Talaromyces flavus* formulations repared by a fermenter for controlling sugar beet seedling damping–off disease in the greenhouse conditions. Academia Journal of Agricultural Research, 7(11): 274–281.

Naraghi, L., Naeimi, S. & Marzban, R. 2019b. Propagation of *Talaromyces flavus* by a fermenter for greenhouse application to control sugar beet seedling damping–off. Acta Biologica Indica, 8(1): 68–75.

Naraghi, L., Naeimi, S., Marzban, R. & Heydari, A. 2020. A study on the development of *Talaromyces flavus* formulations by a fermenter and some of their biological properties. The Journal of Research on the Lepidoptera, 51(1): 74–92.

Naraghi, L., Negahban, M., Heydari, A., Razavi, M. & Afshari–Azad, H. 2018a. Growth Inhibition of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopercisi*, the Causal Agent of Tomato Fusarium Wilt Disease by Nanoformulations Containing Talaromyces flavus. Ekoloji, 106(1): 103–112, Article No: e106006.

Naraghi, L., Negahban, M., Heydari, A., Razavi, M. & Afshari–Azad, H. 2018b. The effects of nanoparticles on sporulation and active population of *Talaromyces flavus*. International Journal of Bio–Technology and Research (IJBTR), 8(2): 27–38.

Naraghi, L. & Razi Nattaj, M. 2022. Efficacy of *Talaromyces flavus* microcapsule in controlling cotton important fungal diseases. Revista De Gestao Social E Ambiental, 16: 2: e03023.

Naraghi, L., Shahriari, D., Sarpeleh, A., Heydari, A. & Afshari Azad, H. 2017. Decrease in the incidence of cucumber Fusarium wilt in Varamin greenhouse using *Talaromyces flavus*. International Journal of Agricultural Scince and Research, 7(4): 143–154.

Negahban, M, Moharramipour, S., Moharramipour, M., Zandi, M. & Pezeshki, M. H. 2011. Oil nano–encapsulation by coacervation method on naturitional indices of Tribolium castaneum (Col: Tenebrionidae). The International journal of artificial organs, 34(8): 667–667.

Ofridam, F., Tarhini, M., Gagniere, E., Mangin, D., Lebaz, N. & Elaissari, A. 2021. pH– sensitive polymers: classification of some fine patentical applications. Polymers Advanced Technologies, 32(4): 1455–1484.

Oritsejafor, J.J. 1987. Influence of moisture and pH on growth and survival of *Fusarium oxysporum* f.sp. *elaeidis* in soil. Transactions of the British Mycological Society, 87(4): 511–517.

Ostertag, F., Weiss, J. & McClements, D.J., 2012. Low–energy formation of ediblenanoemulsions: factors influencing droplet size produced by emulsion phaseinversion. Journal of Colloid and Interface Science, 388(1): 95–102.

Pedone, L., Caponetti, G., Leone, M., Militello, V., Panlo, V., Polizzi, S. & Saladino, M. L. 2005. Synthesis and characterization of cds nanoparticles embedded in a polymethyl methacrylate matrix. Journal of Colloid and Interface Science, 248(2): 495–500.

Pedrosa, A. & Serrano, M.L. 2000. Solubilities of sodium gluconate in water and in aqueous solutions of ethanol and methanol. Journal of Chemical and Engineering Data, 45(3): 461–463.

Pereira, I., Ortegu, R., Barrientus, L., Moya, M., Reyes, G. & Kramm, V. 2009. Development of a biofertilizer based on filamentous nitrogen– fixing cyanobacteria for rice crops in Chile. Journal of Applied Phycology, 21(1): 135–414.

Powison, D.S. & Dawson, C.J. 2022. Use of ammonium sulfate as a sulphor fertilizer: Implications for ammonia volatilization. Soil Use and Management, 38(1): 622–634.

Pylypchuk, L. & Sipponen, M.H. 2022. Organic solvent–free production of colloidally stable spherical lignin nanoparticles of hight mass concenterations. Green Chemistry, 22(1): 8705–8715.

Priyadarshini, E., Pradhan, N., Behari Sukla, L., Kumar Panda, P. & Kanta Mishra, B. 2014. Biogenic synthesis of floral–shaped gold nanoparticles using a novel strain, Talaromyces flavus. Annals Microbiology, 64(3): 1055–1063.

Qureshi, M.A., Nishat, N. & Shahadat, M. 2022. Industrially and biomedically important guargum based nano composites and their methods of synthesis: a review. Advanced Composite Materials, 1(1): 437–459.

Ruwold, J., Planque, J. & Qye, G. 2020. Lignosolfonate salt tolerance and the effect on elusion stability. ACS (American Chemical Society) Omega, 5(25): 15007–15015.

Sharma, S., Kaur, J., Sharma, G., Kishor, T.K., Chauhan, G.S. & Chaunan, K. 2013. Preparation and characterization of pH–responsive guargum. International Journal of Biological Macromolecules, 62(1): 636–641.

Shen, W., Koirala, N., Mukherjee, B., Lee, K., Zhao, M. & Li, J. 2022. Tween 20 stabilized conventional heavy crude oil–in–water emulsions formed by mechanical homogenization. Frontiers in Environmental Science, 10(1): 1–11 (Article No.873739).

Sohail, K., Ullah Khan, I., Shahzd, Y., Hussain, T. & Ranjha, N.M. 2014. pH–sensitive polyvinylpyrrolidone–acrylic acid hydrogels: Impact of material parameters on swelling and drug release. Brazillian Journal of Pharmaceutical Sciences, 50(1): 173–184.

Vakili Bastam, S., Ahmadi, H., Bohlul, H., Shameli, S., Mohammadnia, K. & Ghasemi, J. 2023. Adaptation Evaluation and Quantitative and Qualitative Comparison of New Hybrid Tomato (Solanum lycopersicum) Genotypes in the Farms of Golestan Province. Journal of Crop Production and Processing, 13(2): 57–72.

Valizadeh, H., Nokhodchi, A., Qarakhani, N., Zakeri–Milani, P., Azarmi, S., Hassanzadeh, D. & Lobenberg, R. 2004. Physicochemical characterization of solid dispersions of indomethacin with PEG 6000, Myrj 52, lactose, sorbitol, dextrin, and eudragit® E100. Drug Development and Industrial Pharmacy, 30(3): 303–317.

Wada, R., Fujimoto, K. & Kato, M. 2014. Why is poly (oxyethylene) soluble in water? Evidence from the thermodynamic profile of the conformational equilibria of 1,2–dimethoxyethane and dimethoxymethane revealed by Raman spectroscopy. The Journal of Physical Chemistry B, 118(42): 12223–12231.

Zajkoska, S.P., Mulone, A., Hasal, W.E., Klement, U., Mann, R. & Kautek, W. 2018. Alkoxylated β–naphtol as an additive for tin plating from chloride and methane sulphonic acid electrolytes. Coatings, 8(2): 79.

Preparation and optimization of liquid and microcapsule formulations of *Talaromyces flavus* for management of Fusarium wilt disease of tomato

Laleh Naraghi [1], Seyed Reza Fani [2], Sadegh Jalali [3], Maryam Negahban [4], Shahram Naeimi [5]

1, 4, 5– Associate Professor, Assistant Professor, Associate Professor, Department of Plant Diseases Research, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.
2– Assistant Professor, Plant Protection Research Department, Yazd Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Yazd, Iran.
3– Research instructor, Plant Protection Research Department, Isfahan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Isfahan, Iran.

Corresponding author: Laleh Naraghi, email: lale_naraghi@yahoo.com

Received: Nov., 25, 2023 11(1) 1–18 Accepted: Dec., 31, 2023

Abstract
According to the recent advances in the application of biotechnology in various sciences, in recent years, research has been conducted in the field of preparation of liquid bioformulations and microcapsules of suspension and powder from the important fungal inhibitor *Talaromyces flavus*. In this study, optimization of the mentioned formulations and their use in commercial greenhouses have been done. For this purpose, based on the results of previous greenhouse research, regarding the preparation of a type of liquid bioformulation (liquid formulation containing Potato Dextrose Broth culture medium, temperature of 25 degrees Celsius and dicycloserine or sodium nitrate stabilizer), a type of microcapsule in the form of suspension. A type of microcapsule in powder form was prepared for use in tomato greenhouses. To optimize the liquid formulation, the most suitable emulsifiers and binders in terms of suspensionability were identified as Tween 20 and carboxymethyl cellulose. For the optimization of suspension and powder microcapsules, the most suitable combination of polymer + surfactant in terms of solubility was determined, respectively, the combination of alginate + myristyl alcohol and guargam + calcium lignosulfate. Investigations related to commercial greenhouses were carried out during one year in two regions of Yazd and Isfahan with a history of Fusarium wilt disease. Each study was carried out in the form of a statistical design of complete randomized blocks with eight treatments in four replications. The treatments were: 1 to 3– each of the liquid formulations, suspension microcapsules and powder microcapsules with the method of adding to the soil, 4 to 6– each of the mentioned formulations with the root immersion method, 7– Thalaromin fungicide By the method of adding to the soil, 8– control (without application of formulation and fungicide). The treatments were evaluated by determining the percentage of occurrence and the percentage of severity of fusarium wilt disease. Statistical data analysis and mean comparison was done using Duncan's multiple range test by MS TAT C software program. The results showed that the microcapsule powder with the seedling impregnation method and the liquid formulation with the soil addition method were the most effective treatments by reducing the disease severity percentage by 91.6 and 68.4%, respectively, compared to the control. According to the results Obtained, the method of producing and using each of *Talaromyces flavus* microcapsule and liquid formulations is considered as technical knowledge and it is possible to proceed with their commercialization steps.

Keywords: Biological formulation, Fusarium wilt, *Talaromyces flavus*, Tomato