وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه آموزش و ترویج کشاورزی
همه باهم جهاد کشاورزی
سال ۱۴۰۱
تولید، دانش بنیان و اشتغال آفرین

معاونت علمی و فناوری

شبکه دانش کشاورزی

سلسله برنامه‌های ویدیو کنفرانس انتقال دانش به‌روز در گستره ملی بخش کشاورزی

عنوان:

# تهیه میکروکپسول از قارچ عامل بیوکنترل برای مدیریت بیماری های قارچی خاکزاد محصولات گلخانه ای

سخنران:

لاله نراقی

عضو هیأت علمی موسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور

۱۶ شهریور ۱۴۰۱- ساعت: ۱۱/۳۰-۱۲/۱۵

# مقدمه

اندازه ی میکرومتر: $10^{-6}$ متر

اندازه ی نانومتر: $10^{-9}$ متر

حداکثر مقیاس دید چشم انسان: $10^{-4}$ متر

حداکثر مقیاس دید میکروسکوپ نوری: $2\times10^{-7}$ متر

حداکثر مقیاس دید میکروسکوپ الکترونی: $10^{-10}$ متر یا یک آنگستروم

- نانوذره یا ذره بی نهایت ریز معمولاً به عنوان ذره ای از ماده تعریف می‌شود که قطری بین ۱ تا ۱۰۰ نانومتر (nm) دارد.

- این اصطلاح گاهی اوقات برای ذرات بزرگ تر تا ۵۰۰ نانومتر نیز استفاده می‌شود.

- در حوزه کشاورزی، برای پوشش دهی عوامل زنده و غیر زنده بیوکنترل، از نانوذرات تا اندازه ۲۰۰ نانومتر استفاده شده است.
- در پایین‌تر این محدوده، ذرات فلزی کوچک تر از ۱ نانومتر معمولاً خوشه‌های اتمی نامیده می‌شوند.
(Vert *et al.*, 2012)

# سابقه تحقیق

- دردهه های اخیر نانو تکنولوژی در زمینه های مختلف شیمیایی داروسازی، پزشکی و آفت کش های شیمیایی کشاورزی گسترش چشمگیری داشته است.

- موضوعی که سبب ضرورت تحقیق و توسعه در زمینه آفت کش های نانو می شود، پدیده مقاومت آفات نسبت به آفت کش ها می باشد؛ لذا معرفی آفت کش های نانو به پژوهشگران موجب رونق تحقیق و توسعه در این زمینه نسبتا جدید می شود.



- با توجه به مشکلات زیست محیطی و هزینه های ناشی از مصرف مقادیر زیاد آفت کش های معمولی و نیز مشکلات ناشی از مقاومت آفات به این آفت کش ها تحقیق و توسعه در زمینه آفت کش های نانو به عنوان یک ضرورت می تواند مطرح گردد.

- استفاده از پلیمرهای زیست‌تخریب پذیر در تولید نانو کپسول‌هایی با کارایی بالا و ساخته شده از مواد طبیعی و زیست تجزیه پذیر می تواند گامی مؤثر در این زمینه باشد (Maji *et al.*, 2014).

- تولید نانو کپسول (پوشش ماده موثره: عوامل زنده و غیر زنده بیوکنترل) موجب افزایش قدرت و پایداری و محافظت از ماده موثره در شرایط نامساعد محیطی نظیر نور و رطوبت می شود.



- کاربرد نانو کپسول به پایین آوردن دز مصرفی آفت کش و صرفه اقتصادی و حفاظت از محیط زیست و کاهش خطرات زیست محیطی آن و همچنین صادرات بهتر محصول کمک شایان توجهی می کند (Martin *et al.*, 2010).

- از قارچ *Beauveria bassiana*، با پوشش نانو ذرات نقره به عنوان لارو کش استفاده شد (Prabakaran *et al*., 2016).

- در تحقیقی، در زمینه اثرات تیمار بذور جو و آفتابگردان با نانوذرات نقره دربردارنده قارچ میکوریزایی نشان داد که در تیمار بذر با نانوقارچکش دربردارنده قارچ میکوریزایی در مقایسه با قارچکش معمولی افزایش معنی دار میزان جذب عناصر معدنی توسط ریشه و به تبع آن افزایش معنی دار صفات رویشی وجود داشته است (عباسیان و همکاران، ۱۳۸۹؛ فغانی و رجائی، ۱۳۹۳).

- مواد پوشاننده جهت کپسوله کردن شامل صمغ ، نشاسته ، ژلاتین و پلیمرها می باشد. اخیراً کیتوزان و فسفولیپیدها نیز استفاده می‌شوند.

- با توجه به تحقیقات اخیر به نظر می‌رسد، استفاده از فن آوری نانوکپسول در تولید آفت کش ها به منظور کنترل آفات انباری، می‌تواند نقش مهم در افزایش کارایی و دوام آن‌ها داشته باشد (Prasad *et al.*, 2014).

- تاکنون، برای تهیه نانوقارچکش از جنس قارچ مورد مطالعه در تحقیق حاضر (Penicillium)، دو گزارش در زمینه های پزشکی و کشاورزی وجود داشته است (Priyadarshini *et al*., 2014; Khan and Jameel, 2016).

- در زمینه پزشکی، برای تهیه نانوقارچکش بر علیه قارچ بیماری زای *Candida albicans* از قارچ زنده *Penicillium fellutanum* استفاده شده است.

- در زمینه کشاورزی نیز برای تهیه نانوقارچکش بر علیه برخی عوامل بیماری زای گیاهی، عصاره قارچ *Talaromyces flavus* (تلئومورف قارچ *Penicillium dangeardii*) به کار گرفته شده است (Priyadarshini *et al.*, 2014; Khan and Jameel, 2016).

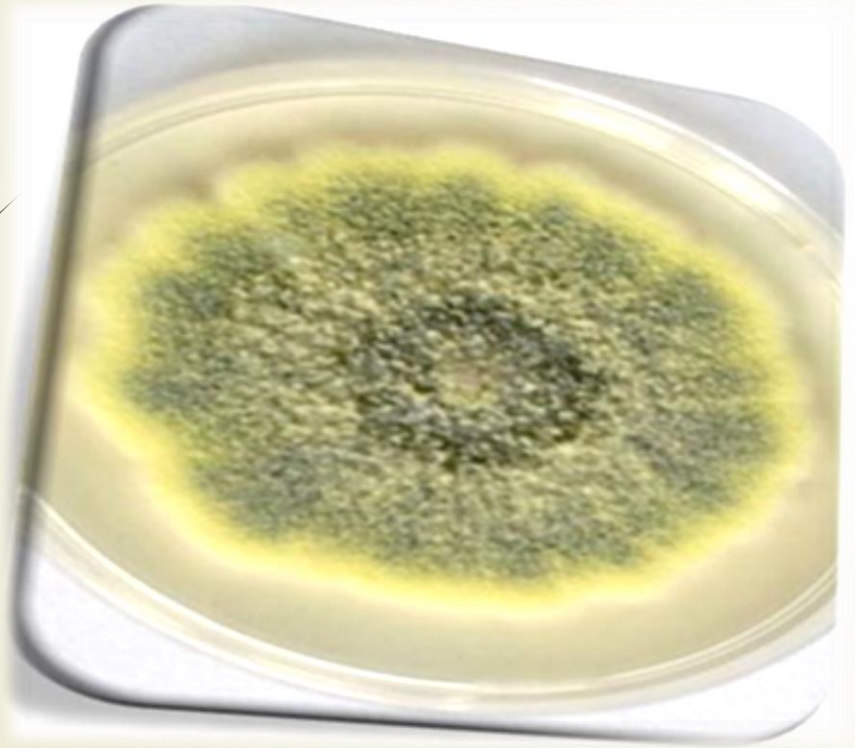
- تحقیقات انجام شده برای تولید میکروکپسول *Talaromyces flavus* در ایران

# عامل مهارگر زیستی (بیوکنترل) : قارچ *Talaromyces flavus*

- **در داخل کشور، بر اساس تحقیقات پیشین (نراقی، ۱۳۹۸)، عامل مهارگر موثر برای کنترل بیماری های قارچی مهم خاکزاد محصولات زراعی وگلخانه ای شامل پنبه، سیب زمینی، چغندرقند، خیار گلخانه ای وگوجه فرنگی**

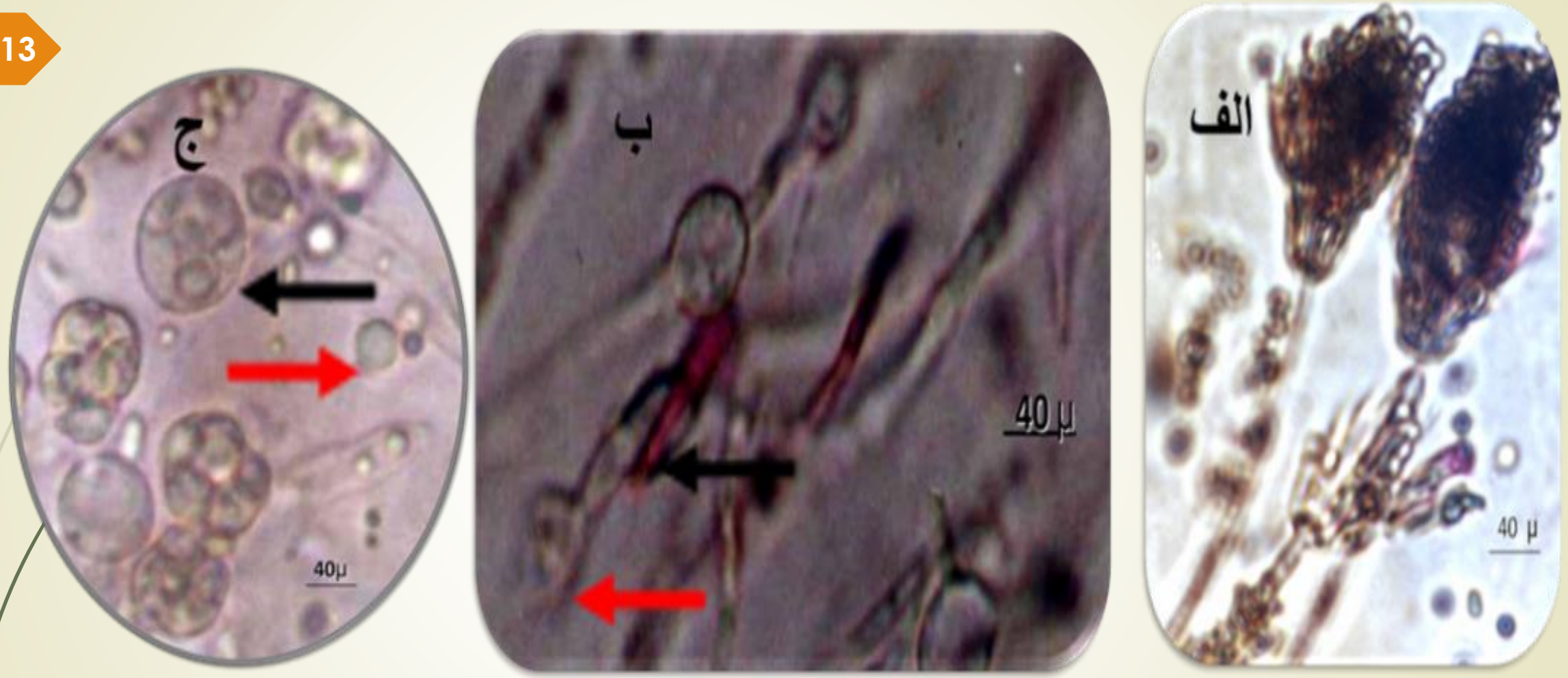
- پژمردگی ورتیسلیومی در پنبه، سیب زمینی، گوجه فرنگی و خیار گلخانه ای
- پژمردگی فوزاریومی در گوجه فرنگی و خیار گلخانه ای
- مرگ گیاهچه رایزوکتونیایی در پنبه، چغندرقند، گوجه فرنگی و خیار گلخانه ای
- بوته میری پیتیومی در گوجه فرنگی و خیار گلخانه ای

# عامل مهارگر زیستی (بیوکنترل) : قارچ *Talaromyces flavus*



پرگنه قارچ *Talaromyces flavus*
روی محیط کشت سیب زمینی
دکستروز آگار (PDA)

# عامل مهارگر زیستی (بیوکنترل) : قارچ *Talaromyces flavus*




الف) شکل غیر جنسی (*Penicillium dangeardii*)،
ب و ج): شکل جنسی (*Talaromyces flavus*)

# انتخاب بستر سبوس برنج برای تکثیر قارچ عامل بیوکنترل، تولید قارچ کش ثبت شده تالارومین و کاربرد آن در مزرعه

فارچ کش بیولوژیکی تالارمین (۲/۵ کیلوگرمی)
شماره ثبت اختراع: ۵۹۰۶۳ مورخ ۱۳۸۸/۲/۳۰
بذری‌های گیاهی قابل کنترل: پژمردگی ورتیسیلیومی و مرگ گیاهچه پنبه،
پنبه چغندرقند: پژمردگی ورتیسیلیومی سیب‌زمینی: پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی
مصرف: همزمان با کاشت به صورت آغشته‌سازی بذر و افزودن به خاک تا عمق کاشت
میزان مصرف در روش افزودن به خاک: ۲/۵ کیلوگرم برای ۱۰۰۰ متر مربع
مصرف در روش آغشته‌سازی بذر: ۱۰۰ گرم برای بذر مصرفی پنبه در ۱۰۰۰ متر مربع؛
ده گرم برای بذر مصرفی چغندرقند و گوجه‌فرنگی در ۱۰۰۰ متر مربع؛
شش کیلوگرم برای غده‌های بذری مصرفی سیب‌زمینی در ۱۰۰۰ متر مربع
تعداد واحد پرگنه‌ساز در هر گرم فارچ کش: $10^9$
مدت ماندگاری: یک سال پس از تولید
بهترین زمان مصرف: شش ماه پس از تولید

# کارآیی تالارومین در کنترل بیماری پژمردگی ورتیسلیومی و مرگ گیاهچه پنبه



در مقایسه با شرایط زارع موجب ۵۰٪ کاهش شدت بیماری پژمردگی ورتیسلیومی، ۳۷٪کاهش درصد مرگ گیاهچه و ۴۷٪ افزایش عملکرد کل پنبه گردید.

**شکل ۹. مزرعه پنبه با کاربرد فرآورده بیولوژیک *T. flavus* (راست) در مقایسه با شرایط زارع (چپ)**

# کارآیی تالارومین در کنترل بیماری مرگ گیاهچه چغندرقند

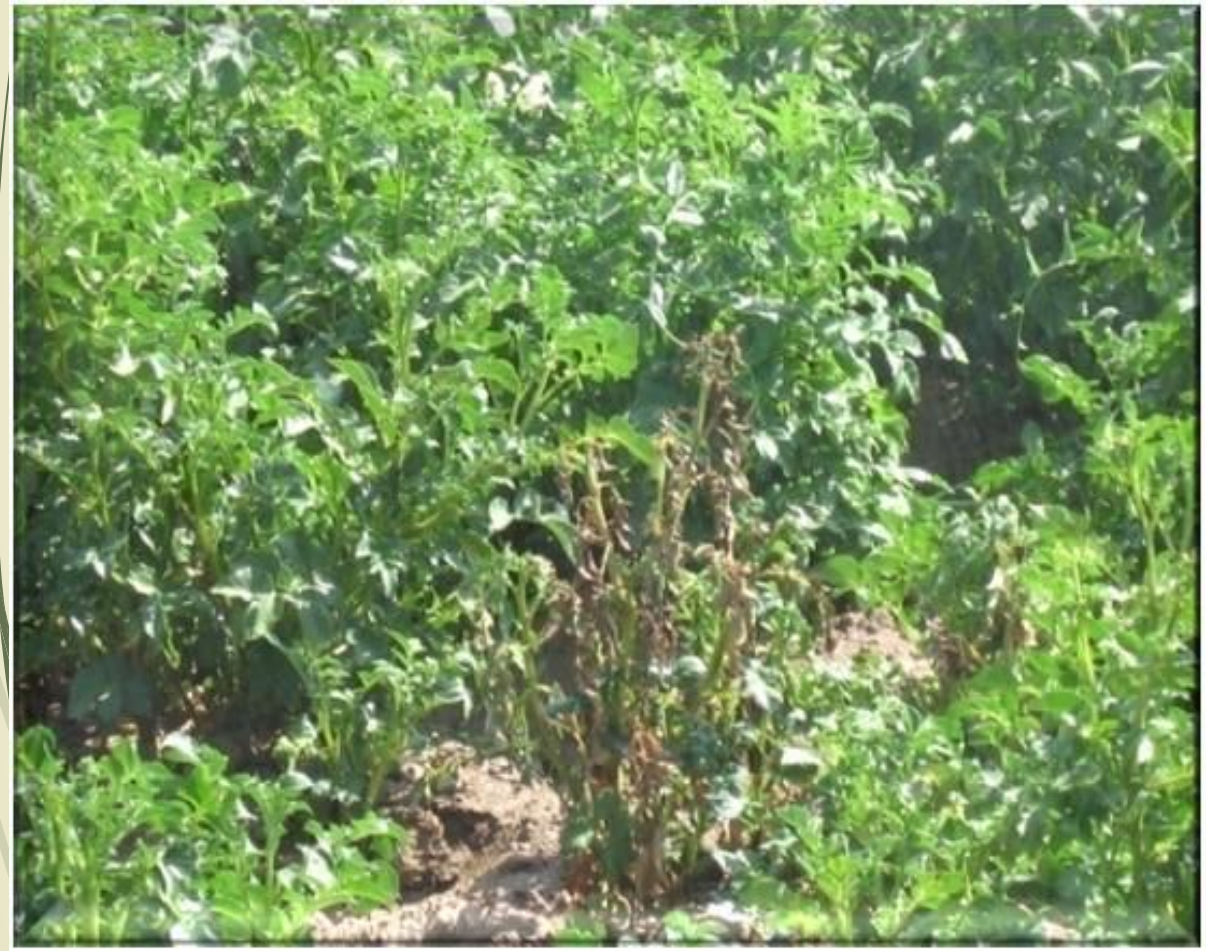
در مقایسه با شرایط زارع موجب ۵۸٪ افزایش تعداد گیاهچه های سالم و ۴۷٪ افزایش عملکرد کل چغندرقند گردید.

مزرعه چغندرقند با کاربرد فرآورده بیولوژیک *T. flavus* (راست) در مقایسه با شرایط زارع (چپ)

# کارآیی تالارومین در کنترل بیماری پژمردگی ورتیسلیومی سیب زمینی

- تیمار تالارومین با تیمار قارچ کش کاربندازیم (شرایط زارع) از لحاظ درصد و شدت بیماری و عملکرد اختلاف آماری معنی داری نشان نداد؛ در حالیکه هر دو تیمار فوق در مقایسه با شاهد (تیمار عاری از هرگونه قارچ کش شیمیایی و یا بیولوژیک) موجب ۴۰٪ کاهش درصد و شدت بیماری و ۱۷ درصد افزایش عملکرد سیب زمینی شدند.

- بنابراین، با توجه به معنی دار نبودن تیمار تالارومین با تیمار قارچ کش کاربندازیم از لحاظ صفات مورد بررسی، تیمار قارچ کش بیولوژیک *T. flavus* جایگزین مناسبی برای قارچ کش شیمیایی کاربندازیم محسوب می شود.

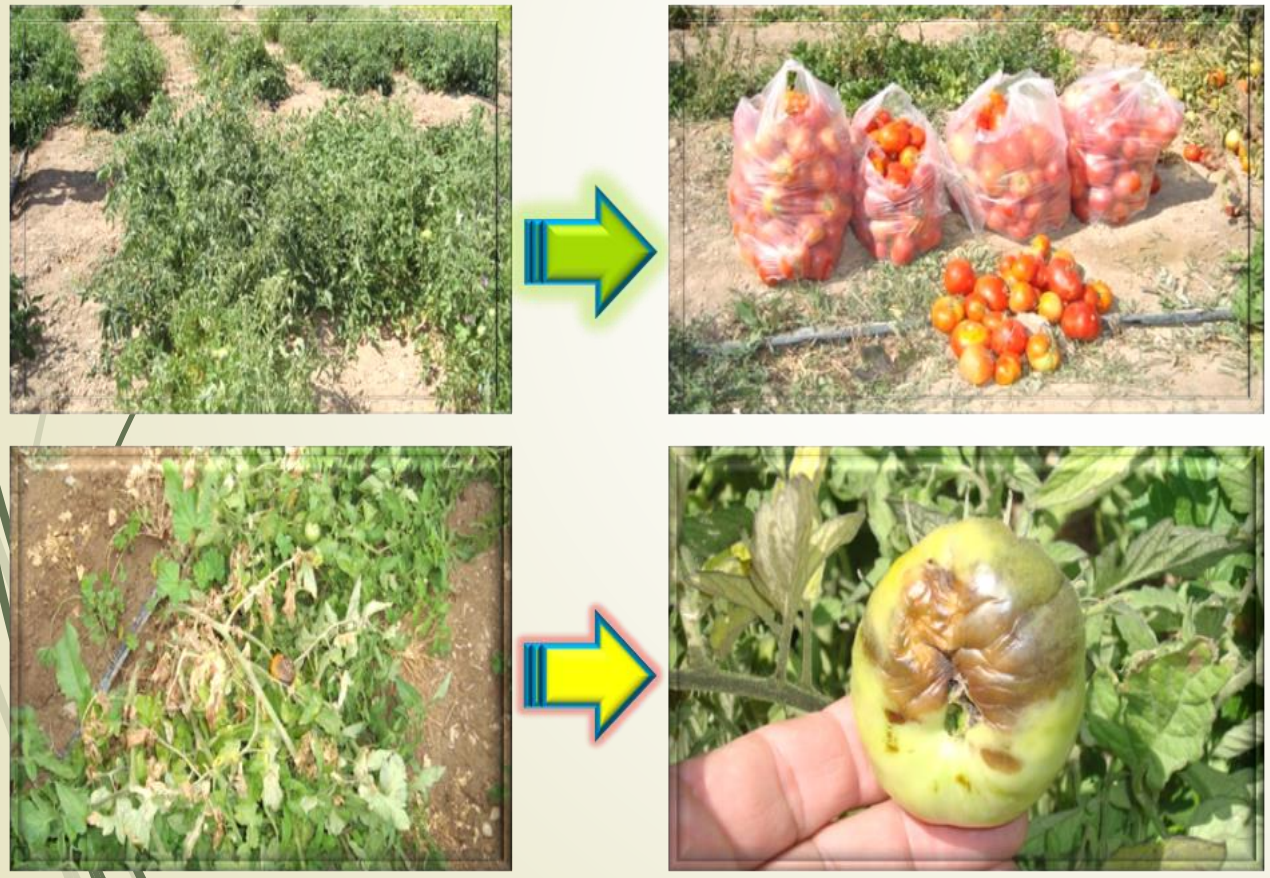


مزرعه سیب‌زمینی با کاربرد تالارومین(راست) در مقایسه با شرایط زارع (چپ)

# کارآیی تالارومین در کنترل بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه فرنگی



کاربرد تالارومین با روش افزایش به خاک در مقایسه با شرایط زارع موجب ۲۲٪ کاهش درصد شدت بیماری و ۲۶٪ افزایش عملکرد کل گوجه‌فرنگی گردید.



**مزرعه گوجه‌فرنگی با کاربرد تالارومین (بالا)**
**در مقایسه با شرایط زارع (پایین)**

## روش، میزان و دفعات کاربرد فرآورده نهایی (قارچ کش بیولوژیک تالارومین)

روش کاربرد به دو صورت آغشته سازی بذر و افزودن به خاک می‌باشد. در روش آغشته‌سازی بذر، بذور به صورت مستقیم با فرآورده نهایی آغشته می‌شوند و همزمان با کاشت در شیارهای کاشت واقع می‌گردند. در روش افزودن به خاک، همزمان با کاشت تا عمق کاشت و ترجیحا در شیارهای کاشت به صورت یکنواخت توزیع می‌شود.

- میزان مصرف در روش افزودن به خاک، ۲/۵ کیلوگرم برای ۱۰۰۰ متر مربع و در روش آغشته‌سازی بذر برای هر یک از محصولات تیمار شونده به شرح ذیل است:

- ۱۰۰ گرم برای بذر مصرفی **پنبه** در ۱۰۰۰ متر مربع
- ده گرم برای بذر مصرفی **چغندرقند و گوجه‌فرنگی** در ۱۰۰۰ متر مربع
- شش کیلوگرم برای غده‌های بذری مصرفی **سیب‌زمینی** در ۱۰۰۰ متر مربع

- دفعات کاربرد، یک دفعه و همزمان با کاشت می‌باشد.

تحقیقات مقدماتی انجام شده و در
دست اجرا برای
تولید فرمولاسیون های دربردارنده قارچ
عامل بیوکنترل
*Talaromyces flavus* با به کار گیری
فن آوری نانو (میکروکپسول *T. flavus*)
با هدف میزان مصرف کم تر و
پایداری بیش تر

تهیه ی کانون

فرمونا سیون در

بردارنده کامل

بیوکنترل یا مارکر

زیستی

*Talaromyces flavus*

نانو فرمولاسیون در بردارنده *T. flavus*
با دو بخش:
بخش پوششی (کپسول با فرمولاسیون های سوسپانسیون و پودر و غیر کپسول با فرمولاسیون امولسیون):
اندازه ذرات در سطح نانو

و بخش عامل بیوکنترل *T. flavus*:
قارچ *T. flavus* با اسپورهای
۲/۵–۳/۵ ×۲/۵–٤ میکرومتر در سطح میکرو



میکروکپسول *Talaromyces flavus*
با دو شکل سوسپانسیون و پودر و
میکروامولسیون *Talaromyces flavus*

## تولید دو نوع میکروکپسول *T. flavus* با فرمولاسیون سوسپانسیون

- تولید نانوکپسول، تلفیقی از روش پلیمریزاسیون و شبکه ای شدن است که بر اساس روش نگهبان و همکاران (۱۳۹۱a، ۱۳۹۱b) و با ایجاد تغییراتی مطابق و متناسب با شرایط رشد قارچ بیوکنترل (تغییر در مقدار یا نوع پلیمر، سورفکتانت ها و روغن ها، اسید چرب و مقدار دور همزن، دما) صورت گرفت.

- در فرآیند پلیمریزاسیون، فاز آلی شامل روغن گیاهی کرچک به همراه مخلوطی از قارچ بیولوژیک بود که در فاز آبی متشکل از مونومرهای پلیمری آب دوست مانند مخلوطی از پلیمرهای **آلژینات و یا فرمالدهید اوره بر حسب میکروکپسول نوع ۱ و یا نوع ۲** ، ترکیبات پلی ساکاریدی نظیر نشاسته، کیتوزان و پلی اتیلن گلیکول اضافه گردید.



- سپس، به مجموع دو فاز، کراس لینکر کلرید سدیم و همچنین سورفاکتانت ها و مواد همراه و روغن های 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، شبکه ای به صورت کپسول در اطراف ذرات قارچ بیولوژیک تشکیل شد.

## ❑تولید میکروکپسول *Talaromyces flavus* با فرمولاسیون پودر

تفاوت های عمده با فرمولاسیون سوسپانسیون :

❖فاز آبی متشکل از مالتودکسترین (Maltodextrine)، زانتان گام (Xanthan Gum)

❖قرارگیری در دستگاه هموژنایزر به مدت سه ساعت با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس کاملا به صورت پودر تبدیل شد. در نهایت، ذرات پلیمر، شبکه ای به صورت کپسول در اطراف ذرات قارچ بیولوژیک تشکیل شد.

## تولید میکرو امولسیون *Talaromyces flavus*

- برای تهیه فرمولاسیون نانوامولسیون حاوی قارچ بیولوژیک *T. flavus* بر اساس روش نگهبان و همکاران (۱۳۹۱a، ۱۳۹۱b) از الگوی خود آرایی (self assemble) استفاده گردید، بدین مفهوم که فرمولاسیون نهایی یک نانو امولسیون بود که ذرات نانویی آب گریز روغن گیاهی در یک فرمولاسیون، فرموله شده است.

- ترکیبات این فرمولاسیون عبارت بودند از: ماده مؤثره قارچ بیوکنترل و روغن گیاهی کرچک با خاصیت آب گریز، سورفکتانت توین، مواد ویسکوزکننده کربوکسی متیل سلولز، مرطوب کننده نارگیل، ترکیبات اسید چرب (اسید اولئیک+اتانول آمید) در فاز آلی و پلیمر زیست سازگار پلی وینیل الکل (لوریل الکل)، ترکیبات پلی ساکاریدی شامل اتیلن گلیکول، نشاسته و کاراگینان در فاز آبی.

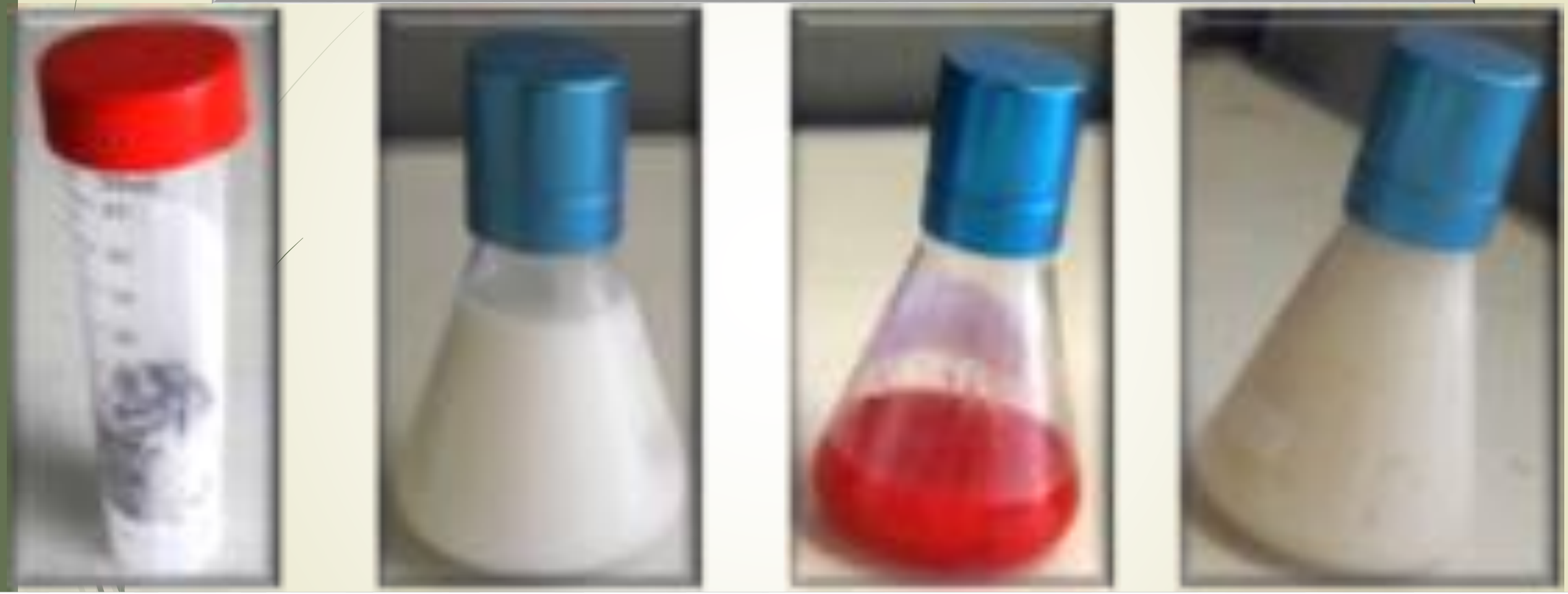
- در مرحله بعد، به مجموع دو فاز آلی و آبی، کراس لینکر (کلرید سدیم) جهت تشکیل نانو ذرات در اطراف قارچ عامل بیوکنترل اضافه شدند.

- قرار گیری در دستگاه هموژنایزر با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس.

- در نهایت، نانوذرات اطراف اسپورهای قارچ بیوکنترل را به صورت شبکه ای، پوشش دادند.

## معرفی کیفی و کمی ترکیبات به کار رفته در صد گرم از فرمولاسیون های تهیه شده

در این تحقیق، چهار فرمولاسیون شامل دو نوع میکروکپسول سوسپانسیون، یک نوع میکرو امولسیون و یک نوع نانوپودر ساخته شد.



**فرمولاسیون های تهیه شده: از راست به چپ) میکروکپسول سوسپانسیون ۱ (F1)، میکروامولسیون (F2)، میکروکپسول سوسپانسیون ۲ (F3) و میکروکپسول پودر (F4)**

| اجزای فرمولاسیون و مقدار هر یک برای تولید صد گرم فرمولاسیون بر حسب گرم | فرمولاسیون | | | |
|---|---|---|---|---|
| | F1 | F2 | F3 | F4 |
| قارچ عامل بیوکنترل | ۱۹ | ۳۵ | ۵۳ | ۵ |
| آلژینات | ۸ | - | - | - |
| فرمالدهید+ اوره | - | - | ۹+ ۵/۱۸ | - |
| لوریل الکل | - | ۵/۱۷ | - | - |
| مالتودکسترین | - | - | - | ۵/۴۱ |
| زانتان گام | - | - | - | ۵/۸ |
| اسید چرب نارگیل | ۳۲ | ۵/۱۷ | ۵/۴ | - |
| اسید چرب اتانول آمید- اسید اولئیک | - | - | - | ۵/۸ |
| نشاسته | - | - | - | ۵/۲۳ |
| پلی اتیلن گلیکول | ۲۰ | ۱۲ | - | - |
| روغن گیاهی کرچک | ۱۶ | ۹ | ۵/۴ | - |
| سورفکتانت توئین ۲۰ | ۵ | ۵ | ۵ | ۵ |
| کلرید سدیم | ۲ | ۲ | ۲ | ۲ |
| بوتانول برای سترون سازی | ۳ | ۳ | ۳ | ۳ |

# بررسی های گلخانه ای
# جهت تعیین مناسب ترین
# دز مصرفی و روش کاربرد

# نمایی از تیمارهای مختلف آزمایش گوجه فرنگی

« شاهد سالم »

« شاهد آلوده »

« تالارومین خاک »

« تالارومین بذر »

« میکروسوپانسیون »
با غلظت ۱ در هزار

«میکروسوپانسیون »
با غلظت ۲ در هزار

« میکروسوپانسیون »
با غلظت ۳ در هزار

« میکرو سوپانسیون »
با غلظت ٤ در هزار

« میکروسوپانسیون »
با غلظت ٥ در هزار

« میکروسوپانسیون بذر »

« میکروپودر»
با غلظت ۱ در هزار

« میکروپودر »
با غلظت ۲ در هزار *

« میکرو پودر »
با غلظت۳ در هزار

«میکرو پودر »
با غلظت٤ در هزار



نمایی از تیمارهای مختلف آزمایش
گوجه فرنگی ( * دارای گلدهی)

« میکرو پودر »
با غلظت۵ در هزار *

« میکروپودر به صورت بذر »

نمایی از درجات آلودگی بیماری پژمردگی فوزاریومی از یک تا پنج در تیمارهای مختلف

« درجه ۵ »
تیمار شاهد آلوده

« درجه۲ »
تیمار میکروپودر
با غلظت۵ در هزار

« درجه ۱»
تیمار میکروسوپانسیون
با غلظت ۱ در هزار

« میکرو پودر »
با غلظت۳ در هزار

«میکرو پودر »
با غلظت۲ در هزار



نمایی از ارزیابی تیمارها (نانوپودر با غلظت های ۲ و۳ در هزار ) از لحاظ کاهش وقوع بیماری و افزایش شاخص های رویشی

- بر اساس بررسی های گلخانه ای فرآورده های بیولوژیک تولید شده با فن آوری نانو برای کاربرد در سطح وسیع (گلخانه های تجاری) با دز مصرفی و روش کاربرد تعیین شده

- فرآورده بیولوژیک منتج از اجرای پروژه های تحقیقاتی با به کار گیری فناوری نانو

میکروکپسول تالارومایسس با شکل سوسپانسیون (راست) و یا امولسیون (چپ)

## ❖ میکروکپسول سوسپانسیون و یا امولسیون تالارومایسس

- میزان و نحوه مصرف و زمان کاربرد در روش افزودن به خاک:
  - برای غلظت پنج در هزار، دو لیتر به حجم۴۰۰ لیتررسانیده و برای یک هکتاراستفاده می شود.
  - زمان کاربرد: هم زمان با کاشت، توزیع در شیارهای کاشت

- میزان و نحوه مصرف در روش آغشته سازی بذر: با غلظت پنج در هزار، بذور مستقیم با سوسپانسیون و یا امولسیون آغشته می شوند.

- فرآورده بیولوژیک منتج از اجرای پروژه های تحقیقاتی با به کار گیری فناوری نانو

میکروکپسول تالارومایسس با شکل پودر

## ❖ میکروکپسول پودر تالارومایسس

- میزان و نحوه مصرف و زمان کاربرد در روش افزودن به خاک:
  - برای غلظت نیم در هزار، ۲۰۰ گرم به حجم۴۰۰ لیتررسانیده و برای یک هکتاراستفاده می شود.
  - زمان کاربرد: هم زمان با کاشت، توزیع در شیارهای کاشت

- میزان و نحوه مصرف در روش آغشته سازی بذر:
با غلظت نیم در هزار، بذور مستقیم با پودر به حجم رسانده شده با غلظت نیم در هزار آغشته می شوند.

- این نتایج، امید بخش بوده و در صورت حصول قطعی از نتایج بررسی های تکمیلی در سطح مزرعه و گلخانه های تجاری، می توان نسبت به انجام مراحل تجاری سازی این فرمولاسیون ها اقدام نمود.

در حال حاضر، جهت بررسی کارآیی فرمولاسیون های به دست آمده در سطح وسیع، پروژه هایی در زمینه های ذیل در حال اجراست:

- به کار گیری فرمولاسیون های جدید در گلخانه های تجاری گوجه فرنگی در مناطق یزد و اصفهان برای مدیریت بیماری پژمردگی فوزاریومی
- به کارگیری فرمولاسیون های جدید در مزارع پنبه استان گلستان برای مدیریت بیماری های پژمردگی ورتیسلیومی و مرگ گیاهچه

# از بذل توجه شما بسیار سپاسگزارم

معاونت علمی و فناوری

شبکه دانش کشاورزی

سلسله برنامه‌های ویدیو کنفرانس انتقال دانش به‌روز در گستره ملی بخش کشاورزی

عنوان:

# تهیه میکروکپسول از قارچ عامل بیوکنترل برای مدیریت بیماری های قارچی خاکزاد محصولات گلخانه ای

سخنران:

لاله نراقی

عضو هیأت علمی موسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور

۱۶ شهریور ۱۴۰۱- ساعت: ۱۲/۱۵-۱۱/۳۰