فرمولاسیون نانوامولسیون اسانس دارچین و بررسی خواص ضد قارچی آن در کنترل قارچ *Botrytis cinerea*

مریم احسنی ایروانی[۱]، مهدی بیکدلو*[۲]

[۱و۲] دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی و محیط زیست، دانشگاه اراک، اراک، ایران

*نویسنده مسئول:m-bikdeloo@araku.ac.ir

چکیده

یکی از بیماری‌های مهم گیاهی، کپک خاکستری است که توسط قارچ *Botrytis cinerea* به وجود می آید. امروزه کاربرد اسانس‌های گیاهی بجای سموم و قارچکش‌های شیمیایی بدلیل سلامت جامعه و عوامل زیست محیطی در حال گسترش می‌باشد. ناپایداری فیزیکی و شیمیایی اسانس‌ها یکی از مشکلات موجود در این زمینه می باشد که استفاده از نانوامولسیون اسانس‌ها می‌تواند برطرف کننده این مشکلات باشد. در این تحقیق، پس از تهیه اسانس دارچین و ساختن نانوامولسیون آن، مشخصات فیزیکی و شیمیایی فرمولاسیون حاصل بررسی شد. اندازه ذرات نانوامولسیون در محدوده ۳۵ نانومتر تعیین گردید. اسانس و نانوامولسیون اسانس دارچین در غلظت‌های نیم و یک درصد برای کنترل قارچ *B. cinerea* در شرایط کشت درون شیشه‌ای بکار برده شد. نتایج نشان داد که فرم نانوامولسیون اسانس توانایی کنترل کامل قارچ در هر دو غلظت را دارا می باشد و کارایی اثر اسانس را بالا برده است، از اینرو نانوامولسیون اسانس دارچین برای ساخت قارچکش‌های طبیعی می‌تواند توصیه شود.

واژه‌های کلیدی : دارچین، اسانس، نانوامولسیون، قارچکش.

مقدمه

قارچ *Botrytis cinerea* عامل وقوع کپک خاکستری، یک قارچ نکروتروفیک با گستردگی جهانی است که می‌تواند بیش از ۲۰۰ محصول مهم اقتصادی مثل سبزی‌ها، گیاهان زینتی، غده‌ها و میوه‌ها را تحت تأثیر قرار دهد و خسارت‌های زیادی در مراحل قبل و پس از برداشت به این محصولات وارد می کند (Van Zyl *et al.*, 2010). کنترل این بیماری بسیار مشکل بوده و اصلی‌ترین روش کنترل آن استفاده از قارچکش‌های شیمیایی می باشد. استفاده بی رویه از انواع مختلف قارچکش‌ها، منجر به بروز مقاومت در این قارچ در برابر بسیاری از قارچ‌کش ها شده است. علاوه بر این، کاربرد این قارچکش‌های شیمیایی آسیب‌هایی زیست محیطی و بهداشتی برای موجودات غیرهدف از جمله انسان در پی دارد که با خاصیت تجمعی در بدن موجودات زنده با خاصیت سرطان‌زایی همراه است (علیزاده و همکاران، ۱۳۹۴).

در کشاورزی مدرن بدلیل نگرانی‌های عمده از مضرات قارچکش‌های شیمیایی در سلامت انسان و نگرانی‌های اکولوژیکی مرتبط با استفاده بیش از حد این ترکیبات، مطالعه و یافتن ترکیبات جایگزین برای این قارچکش‌های شیمیایی که هم از نظر زیست محیطی و هم از نظر سلامت انسانی مشکل ساز نبوده ضروری می‌باشد (Ultee *et al.*, 2002). در دهه اخیر شاهد افزایش تحقیقات در زمینه متابولیت‌های ثانویه تولید شده از گیاهان برای کشف آنتی میکروب ها و آنتی اکسیدانت های جدید برای جایگزینی با ترکیبات سنتتک هستیم. برای این منظور عصاره و اسانس بسیاری از گیاهان دارای فعالیت آنتی میکروبی و آنتی اکسیدانتی مورد مطالعه قرار گرفته است (Gyawali and Ibrahim 2014). از جمله مشکلات اساسی در ارتباط با استفاده از اسانس‌های گیاهی در زمینه کنترل بیماری‌های گیاهی می توان به فرار بودن، حلالیت پایین در آب، اکسید شدن سریع و بی ثباتی شیمیایی آنها در حضور هوا، نور، رطوبت و دمای بالا اشاره کرد. از اینرو که قبل از کاربرد اسانس‌های گیاهی در کنترل بیماری‌های گیاهی باید به فکر یافتن روش جدیدی بود تا کارایی آنها را افزایش دهد (Pillmoor *et al.*, 1993). یکی از مهم‌ترین روش‌ها، استفاده از فرمولاسیون جدید و ایجاد تغییراتی است که می‌تواند روی اسانس‌ها اعمال شود تا کیفیت و میزان تاثیر آن‌ها افزایش یابد. از اینرو، استفاده از نانوامولسیون می‌تواند سبب افزایش پایداری ترکیبات فرار، محافظت آنها در برابر تأثیرات متقابل با سایر ترکیبات و افزایش خواص ضد میکروبی از طریق افزایش جذب سلولی شود (Donsi et al. 2011).

هدف از انجام این پژوهش بررسی اثر اسانس و فرم نانواملسیون اسانس گیاه دارچین بر کنترل قارچ *B. cinerea* عامل کپک خاکستری در شرایط درون شیشه‌ای می‌باشد تا در صورت دستیابی به نتایج مطلوب، بتوان از آن به‌عنوان جایگزین قارچکش‌های شیمیایی استفاده کرد.

مواد و روش‌ها

اسانس گیاه دارچین از شرکت داروسازی باریج اسانس تهیه شد و تا زمان انجام پژوهش در دمای ۴ درجه سانتی گراد در درون یخچال نگهداری گردید.

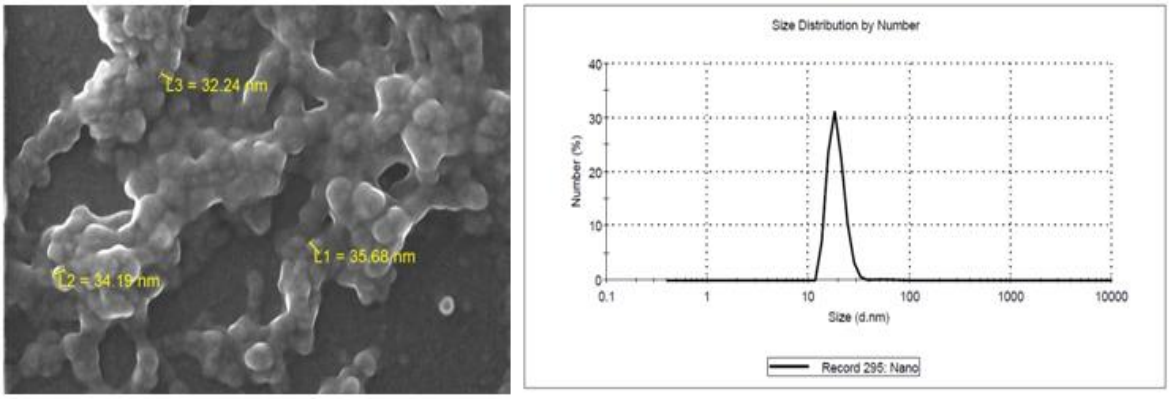
نانو امولسیون اسانس دارچین بر اساس روش ژانگ و همکاران (۲۰۱۹) با تغییر جزئی تهیه و در دمای یخچال و دور از نور نگهداری گردید. با استفاده از بافر فسفات ۱۰ درصد با pH=7 رقت های ۰،۵ و ۱ درصد تهیه شد. برای تهیه محلول نانو امولسیون دارچین از توئین ۸۰ و اسپن ۶۰ استفاده شد.

اندازه ذرات و توزیع ذرات نانو امولسیون‌های تهیه شده به وسیله میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و دستگاه DLS (Dynamic Light Scattering) تعیین گردید.

جدایه تک کنیدی قارچ *B. Cinera* که قبلا از روی گوجه فرنگی جداسازی شده بود، برای کشت روی محیط کشت PDA استفاده شد. محیط کشت PDA از شرکت مرک آلمان خریداری و در آزمایشگاه آماده سازی گردید. آزمایش با ۵ تیمار شامل شاهد، نانو امولسیون اسانس ۰/۵ درصد نانو امولسیون اسانس ۱ درصد، اسانس دارچین ۰/۵ درصد و اسانس دارچین ۱ درصد به روش اختلاط اسانس با محیط کشت PDA طراحی شد. با استفاده از چوب پنبه سوراخ کن، دیسک‌هایی به قطر ۵ میلی متر از کشت‌های جوان قارچ مذکور تهیه شدند و یک دیسک قارچ در قسمت پتری حاوی محیط کشت قرار داده شد. بلافاصله پس از کشت قارچ دور پتری با پارافیلم مسدود شد. پتری های کشت شده در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد. میزان اثر تیمارهای مورد بررسی پس از رشد کامل قارچها در پتری های شاهد مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج و بحث

نتایج مربوط به متوسط قطر حجمی و توزیع اندازه ذرات در محلول نانو امولسیون اسانس گیاه دارچین در محدوده ۳۵ نانومتر قرار دارند (شکل ۱).

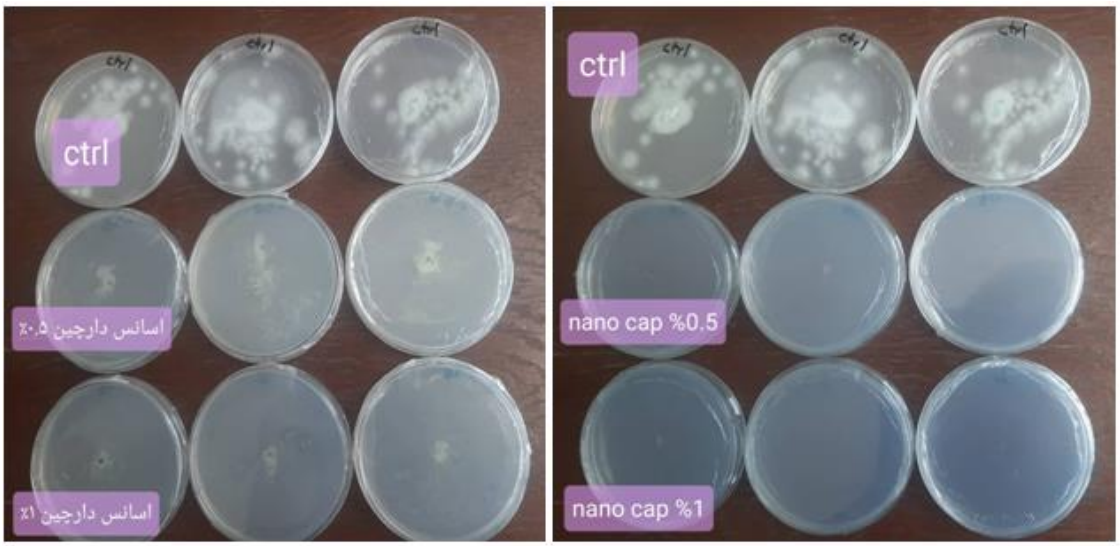


شکل ۱) اندازه و توزیع ذرات نانو امولسیون دارچین (برحسب نانومتر)

نتایج بدست آمده از بررسی اثر ضد قارچی اسانس و نانواملسیون اسانس دارچین بر رشد قارچ *B. cinerea* نشان داد که به طور کلی با افزایش غلظت اسانس، میزان فعالیت ضد قارچی افزایش یافت. میزان اثر نانواملسیون اسانس دارچین در هر دو غلظت بطور کامل از رشد قارچ جلوگیری کرده است ولی در علظت ۰/۵ درصد اسانس دارچین پس از گذشت هفت روز مقدار خیلی کمی رشد قارچ مشاهده گردید (شکل ۲و۳). نتایج آنالیز اسانس نشان داده است که ترکیب غالب اسانس دارچین ماده سیناماآلدهید است که خاصیت ضد

قارچی و ضد میکروبی آن ثابت شده است (Tajkarimi *et al.*, 2010). مطابق نتایج ما در این تحقیقات قبلی نشان داده شده است که نانوامولسیون اسانس دارچین، آویشن دنایی و مرزه خوزستانی در مقایسه با اسانس، فعالیت ضد قارچی بیشتری در کنترل پوسیدگی خاکستری و پوسیدگی نرم رایزوپوسی دارد (علیزاده و همکاران، ۱۳۹۴). بطور کلی نتایج نشان داد که فرم نانوامولسیون اسانس توانایی کنترل کامل قارچ در هر دو غلظت نیم و یک درصد را دارا می باشد و کارایی تاثیر اسانس بالا برده است. از اینرو نانوامولسیون اسانس دارچین برای ساخت قارچکش طبیعی بر علیه قارچ *B. cinerea* می‌تواند توصیه شود.

شکل ۲) میزان رشد قارچ در تیمارهای مختلف پس از سه روز



شکل ۳) میزان رشد قارچ ها در تیمارهای مختلف پس از هفت روز

منابع

علیزاده، ح. ر.، فرزانه، م. و اعظمی، ذ. ۱۳۹۴. تأثیر نانوامولسیون اسانس دارچین در کاهش پوسیدگی های پس از برداشت میوه توت فرنگی. کنترل بیولوژیک آفات و بیماریهای گیاهی. ۴(۱): ۴۴-۷۵.

Donsi, F., Annuanziata, M., Sessa, M. and Ferrari, G. 2011. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. Food Science and Technology 44: 1908-1914.

Gyawali, R. and Ibrahim, S.A. 2014. Natural products as antimicrobial agents. Food Control 46: 412-429.

Pillmoor, J. B., Wright, K. and Terry, A. S. 1993. Natural products as a source of agrochemicals and leads for chemical synthesis. Pesticide science 39, 131-140.

Tajkarimi, M., Ibrahim, S. and Cliver, D. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food Control 21(9): 1199-1218.

Ultee, A., Bennik, H.J., and Moezelaar, R. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen Bacillus cereus. Applied and Environmental Microbiology. 68: 1561- 1568.

Van Zyl, S.A., J.C. Brink, F.J. Calitz, S. Coertze and P.H. Fourie. 2010. The use of adjuvants to improve spray deposition and Botrytis cinerea control on Chardonnay grapevine leaves. Crop Prot. 29: 58-67.

Zhang, L.; Zhang, F.; Fan, Z.; Liu, B.; Liu, C.; Meng, X. DHA and EPA nanoemulsions prepared by the low-energy emulsification method: Process factors influencing droplet size and physicochemical stability. Food Res. Int. 2019, 121, 359–366.

Nano emulsion formulation of cinnamon essential oil and evaluation of its antifungal properties in the control of *Botrytis cinerea*

Maryam Ahsani Erevani[1] and Mahdi Bikdeloo[2*]
[1,2*] Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture & Natural Resources, Arak University, Arak, Iran
[*]*Corresponding Author: m-bikdeloo@araku.ac.ir*

Abstract
One of the most important plant diseases is gray mold caused by *Botrytis cinerea*. Today's, the use of plant essential oils instead of chemical fungicides is expanding due to community health and environmental factors. Physical and chemical instability of essential oils is one of the problems in this field so the use of nano emulsion form of essential oils can solve these problems. In this study, after preparing cinnamon essential oil and making its nano emulsion form, the physical and chemical properties of the nano emulsion preparation were determined. The particle size of nano emulsion was determined in the range of 35 nm. Essential oil and nano emulsion of cinnamon essential oil in concentrations of 0.5 and 1% were used against *B. cinerea* in vitro condition. The results showed that the nano emulsion form of essential oil has the ability to inhibit of fungal growth in both concentrations and it has improved the effectiveness of the essential oil. Therefore, nano emulsion of cinnamon essential oil can be recommended for making natural fungicides.
***Keywords*:** Cinnamon, Essential oil, Nano emulsion, Fungicide.
.