

УДК 632.4/937; 632.911.2; 581.2

UDC 632.4/937; 632.911.2; 581.2

4.1.3. Агрохимия, агропочвоведение, защита и карантин растений (биологические науки, сельскохозяйственные науки)

4.1.3. Agrochemistry, agro-soil science, plant protection and quarantine (biological sciences, agricultural sciences)

ЗАЩИТА КЛУБНЕЙ КАРТОФЕЛЯ ОТ ПОСЛЕУБОРОЧНОЙ ГНИЛИ АЛЬТЕРНАРИОЗЫ НАНОЧАСТИЦАМИ ХИТОЗАНА С РАСТИТЕЛЬНЫМИ КОМПОНЕНТАМИ

PROTECTION OF POTATO TUBERS FROM POST-HARVEST ALTERNARIA ROT BY CHITOSAN NANOPARTICLES WITH PLANT COMPONENTS

Зеитар Елсайед Мохаммед
аспирант, кафедра биотехнологии, биоэкологии, почвоведения и управления земельными ресурсами, ассистент кафедры фитопатологии Агрономический факультет, Агробиологический факультет
Scopus ID: 57221497255
ORCID ID: 0000-0003-2106-556X e-mail: elsayedzeitar@gmail.com
Астраханский государственный университет им. В. Н. Татищева, Астрахань, 414056, Россия
Даманхурский Университет, Даманхур, 22516, Египет

Zeitar Elsayed Mohammed
Postgraduate student at the Department of Biotechnology, Bioecology, Soil Science and Land Management, Assistant Lecturer at the Department of Plant pathology, Faculty of Agriculture, Agrobiological Faculty
e-mail: elsayedzeitar@gmail.com
Scopus ID: 57221497255
ORCID ID: 0000-0003-2106-556X
Astrakhan State University named after V. N. Tatishchev, Astrakhan, 414056, Russia
Damanhour University, Damanhour, 22516, Egypt

Сухенко Людмила Тимофеевна
доктор биологических наук, профессор, доцент кафедры микробиологии
ORCID ID: 0000-0001-5841-655X
ResearcherID: GWN-0323-2022
e-mail: sukhenko@list.ru
Астраханский государственный университет им. В.Н. Татищева, Астрахань, 414056, Россия

Sukhenko Liudmila Timofeevna
Doctor of Biological Sciences, Professor, Associate Professor of the Department of Microbiology
ORCID ID: 0000-0001-5841-655X
ResearcherID: GWN-0323-2022
e-mail: sukhenko@list.ru
Astrakhan State University named after V. N. Tatishchev, Astrakhan, 414056, Russia

Некоторые биологически активные вещества растений, такие как эфирные масла растений, в том числе масло лаванды, обладают активностью против грибных заболеваний растений. Однако летучие эфирные масла легко испаряются и разлагаются под воздействием различных факторов окружающей среды. Решения этой проблемы инкапсулирование эфирного масла наночастицами хитозана для повышения антифунгальной активности для защиты клубней картофеля от альтернариозной гнили, вызванной *Alternaria alternata* методом искусственного заражения. Масло лаванды было инкапсулировано в наночастицы хитозана методом ионного гелеобразования. В результате с помощью СЭМ микроскопии были обнаружены сферические наночастицы с эфирным маслом (диапазон размеров 130–490 нм). Превосходящая биологическая эффективность инкапсулированного масла лаванды по сравнению со свободным маслом или чистым нанохитозаном была продемонстрирована. Инкапсулированное масло в норме 10 г/т значительно снизило индекс поражения клубней картофеля в

Some biologically active plant substances, such as plant essential oils, including lavender oil, have activity against plant fungal diseases. However, volatile essential oils easily evaporate and decompose under the influence of various environmental factors. The solution to this problem is encapsulation of essential oil with chitosan nanoparticles to increase antifungal activity for protecting potato tubers from *Alternaria alternata* rot, using the method of artificial infection. Lavender oil was encapsulated into chitosan nanoparticles by ionic gelation method. As a result, SEM microscopy revealed spherical nanoparticles containing essential oil (size range 130–490 nm). The superior biological effectiveness of encapsulated lavender oil compared to free oil or pure chitosan nanoparticles has been demonstrated. Encapsulated oil at a rate of 10 g/t significantly reduced the disease index on potato tubers within 21 days at a temperature of 21±2°C. Biological effectiveness was 91.7%. According to these results, the technology of nanoencapsulation of lavender essential oil by chitosan nanoparticles may be an effective method for protecting potatoes from fungal spoilage

течение 21 дня при температуре $21\pm 2^\circ\text{C}$.
Биологическая эффективность составляла 91,7%.
Согласно этим результатам, технология создания инкапсулированного масла лаванды наночастицами хитозана может быть эффективным методом защиты картофеля от грибной порчи

Ключевые слова: НАНОТЕХНОЛОГИИ, ЭФИРНЫЕ МАСЛА, ХИТОЗАН, ALTERNARIA, ПРОТИВОГРИБНАЯ АКТИВНОСТЬ, ИОННОЕ ГЕЛЕОБРАЗОВАНИЕ, СУХАЯ ГНИЛЬ

Keywords: NANOTECHNOLOGY, ESSENTIAL OILS, CHITOSAN, ALTERNARIA, ANTIFUNGAL ACTIVITY, IONIC GELATION, DRY ROT

<http://dx.doi.org/10.21515/1990-4665-194-037>

Введение. Альтернариозная гниль картофеля (черная пятнистость) относится к заразным и разрушительным грибным болезням послеуборочного урожая клубней картофеля и вызывается несколькими видами *Alternaria* sp.. Конидии альтернариоза смываемые с листьев, также могут поражать клубни. Симптомы черной пятнистости альтернариоза на клубнях — темные, слегка вдавленные поражения. Сухая гниль клубней вызывает потери при хранении, снижает качество клубней картофеля и снижает всхожесть семенного картофеля [1]. *Alternaria alternata* может заражать плоды в основном через раны или естественные отверстия, поэтому борьба с альтернариозной гнилью зависит от осторожного обращения во время сбора, мытья и упаковки для предотвращения повреждений, которые открывают путь для инфекции [2]. Основным методом борьбы с альтернариозной гнилью является применение химических фунгицидов.

Обеспокоенность по поводу токсического воздействия синтезированных пестицидов и повышения устойчивости патогенов к этим соединениям усилила необходимость выявления новых альтернативных природных противогрибных веществ с использованием инновационных технологий [3]. Использования химических веществ можно избежать, заменив

<http://ej.kubagro.ru/2023/10/pdf/37.pdf>

их веществами растительного происхождения, такими как растительные экстракты и эфирные масла (ЭМ).

Эфирные масла представляют собой естественные смеси биоактивных веществ, таких как терпеноиды, терпены и ароматические компоненты, получаемые из растений. Разнообразие состава эфирных масел позволяет контролировать возбудителей растений с помощью прямого противогрибного эффекта и индукции резистентности [4]. Эфирное масло лаванды (ЭМЛ), получаемое путем паровой дистилляции цветков *Lavandula angustifolia*, является богатым источником антимикробных веществ.

Однако эфирные масла представляют собой летучие соединения, которые легко испаряются и разлагаются под воздействием повышенной температуры, давления, света или кислорода, что приводит к снижению их активности в процессе применения для защиты от грибных болезней сельскохозяйственных продуктов. Кроме того, для конкретных видов применения требуется контролируемое высвобождение [5]. С целью повышения стабильности эфирных масел и защиты их от разрушения различными факторами некоторыми авторами предлагается новая технология нанокапсулирования. Эфирные масла, помещенные в нанокапсулы, имели большую площадь поверхности, сохранность летучих компонентов, биодоступность, контролируемое высвобождение и целевую доставку инкапсулированных ингредиентов.

Хитозан, в качестве инкапсулирующих агентов, является экономически эффективным носителем, широко используемым в фармацевтических и сельскохозяйственных областях, благодаря его биоразлагаемости, биосовместимости, доступности, катионной безопасности заряда и большой

площади поверхности для адсорбции. Хитозан широко используется для инкапсуляции биоактивных соединений, в том числе эфирных масел [5].

Цель исследований. целью данного исследования является синтез нанопрепарата эфирного масла лаванды с наночастицами хитозана методом ионного гелеобразования и его использование для защиты клубней картофеля от послеуборочной альтернариозной гнили.

Материалы и методы исследований. В качестве объектов исследования использовали клубни картофеля сорта Ривьера (код в реестре РФ. 8953649), выращенного на поле КФХ Джафаров Нажмудин Вагидович (Лиманский район, г. Астрахань, Нижневолжский регион РФ), и исходный штамм гриба *Alternaria alternata* strain 1 (из предыдущего исследования) был выделен из естественно инфицированных клубней картофеля.

Использовали хитозан (полученный из панцирей крабов) с молекулярной массой 150 кДа и степенью деацетилирования около 85%, который был приобретен у компании "хитозановые технологии" (город Энгельс, Российская Федерация). Масло лаванды из цветков *Lavandula Angustifolia* было приобретено с Национальном исследовательском центре (г. Каир, Египет).

Синтез инкапсулированного эфирного масла лаванды с наночастицами хитозана (ЭМЛ/ХиНЧ). ЭМЛ/ХиНЧ получали ионным гелеобразованием по методу Keawchaoon and Yoksan (2011)[6]. Различное содержание эфирных масел использовали для получения различных массовых соотношений хитозана к эфирному маслу (1:0,0; 1:0,25; 1:0,50; 1:0,75; 1:1,00 и 1:1,25) соответственно.

Характеристики инкапсулированного эфирного масла с наночастицами хитозана. Морфологию наночастиц изучали с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) (TESCAN VEGA, Чехия). Высушенные наночастицы (1 мг) диспергировали в деионизированной воде (20 мл) и обрабатывали ультразвуком в течение 10 мин. Одну каплю дисперсии, содержащей наночастицы хитозана (нагруженные или ненагруженные эфирными маслами), наносили на кремниевую пластину и сушили при комнатной температуре. Высушенные наночастицы покрывали углеродом в высоком вакууме, и затем исследовали.

Определение антифунгальной активности инкапсулированного и свободного эфирного масла (in vitro). Антифунгальное исследование проводили методом заливки [7]. Инкапсулированное, и свободное эфирное масло титровали в питательной среде для получения конечных концентраций: 0,0–4,0 г/л. Диагностическим признаком для определения степени эффективности препарата является процент подавления (ингибирование) роста мицелия патогена по сравнению с контролем (без обработки). Биологическую эффективность (БЭ) рассчитывали по формуле Аббота:

$$\text{БЭ (\%)} = \left[\frac{C-T}{C} \right] \times 100$$

Где С и Т - радиальный рост (мм) гриба в контрольной и обработанной чашках Петри соответственно. Для каждой обработки было проведено по три повторения, и весь эксперимент был повторен трижды.

Биологическая эффективность инкапсулированного и свободного эфирного масла при защите картофеля от альтернариозная гнили проводили методом искусственного заражения (24 часа до обработок) клубней картофеля (*in vivo*) [8]. Клубни картофеля обрабатывали путем опрыскивания клубней в

норме свободного эфирного масла (100 г/т), наночастицами хитозана (20 г/т), нанопрепарата эфирного масла (10 г/т), и стерилизованной дистиллированной водой в качестве контроля, расход рабочей жидкости 10 л/т, с последующим естественным просушиванием. Обработанные клубни инкубировали в течение 21 дня при температуре $21\pm 2^\circ\text{C}$ при относительно высокой влажности в пластиковых ящиках. Индекс поражения оценивали методом Ammar et al., (2018) [9].

Результаты исследования. *Морфология и размер наночастиц.* Сканирующая электронная микроскопия применялась для наблюдения формы и размера наночастиц. СЭМ-изображения наночастиц хитозана и наночастиц хитозана, содержащих эфирное масло, демонстрируют сферическую форму.

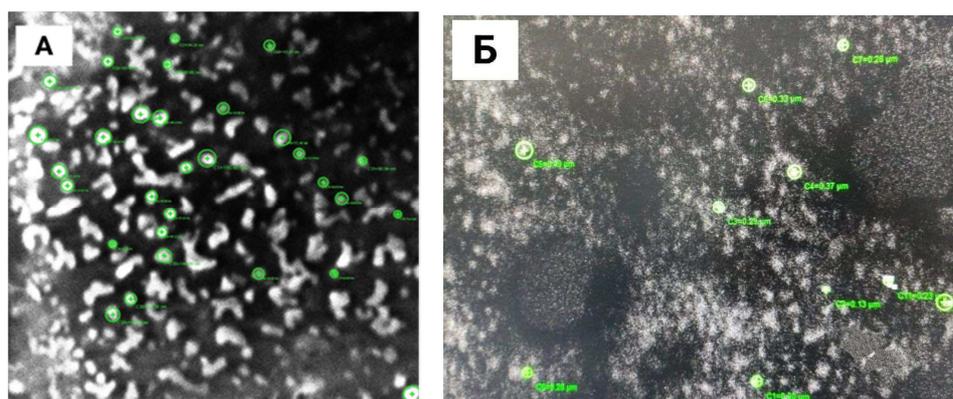


Рисунок 1 - СЭМ-изображение наночастиц хитозана ХиНЧ (А), масло лаванды инкапсулированное наночастицами хитозана ЭМЛ/ХиНЧ (Б).

Отдельные наночастицы хитозана представляли со средним размером 79,41–186,4 нм (Рис. 1.А). Однако, размеры наночастиц хитозана, насыщенных эфирными маслами, были распределены в диапазоне 130–490 нм (Рис. 1. Б). Оказалось, что размер наночастиц хитозана меньше по сравнению с наночастицами содержащими эфирные масла. Увеличение размера наночастиц происходит за счет добавления (загрузки) масел в наночастицы

хитозана, что свидетельствует об успешности наноинкапсулирования эфирных масел. Подобные результаты получены и у ряда других исследователей. Сообщалось о диапазоне размеров наночастиц (532,6–716,6 нм), когда карвакрол был инкапсулирован в наночастицы хитозана. [10] получили размер наночастиц (309,8–402,2 нм), когда эфирное масло орегано было инкапсулировано в наночастицы хитозана. Наночастицы размером от 141,4 до 181,6 нм были получены, когда эфирное масло *Cinnamotum zeylanicum* инкапсулировали наночастицами хитозана методом ионного гелеобразования [5].

Антифунгальная активность, то есть ингибирование роста мицелия *Alternaria alternata* различными концентрациями свободного (ЭМЛ) и инкапсулированного масла (ЭМЛ/ХиНЧ), и наночастиц хитозана (ХиНЧ) *in vitro* была исследована в различных концентрациях, результаты представлены на рисунке 2. Снижение роста мицелия было прямо пропорционально концентрации тестируемого материала в среде. Наночастицы хитозана приводили к полному ингибированию роста мицелия при концентрации 2 г/л. Чистое (свободное) эфирное масло лаванды проявило антифунгальную активность в отношении *Alternaria alternata* со значением МИК 10 г/л (рис. 2). Масло лаванды инкапсулированное наночастицами хитозана (нанолекарство лавандового масла) демонстрировало значительное усиление антифунгальной активности при самой низкой концентрации 1 г/л (рис. 2), и является самый эффективный вариант.

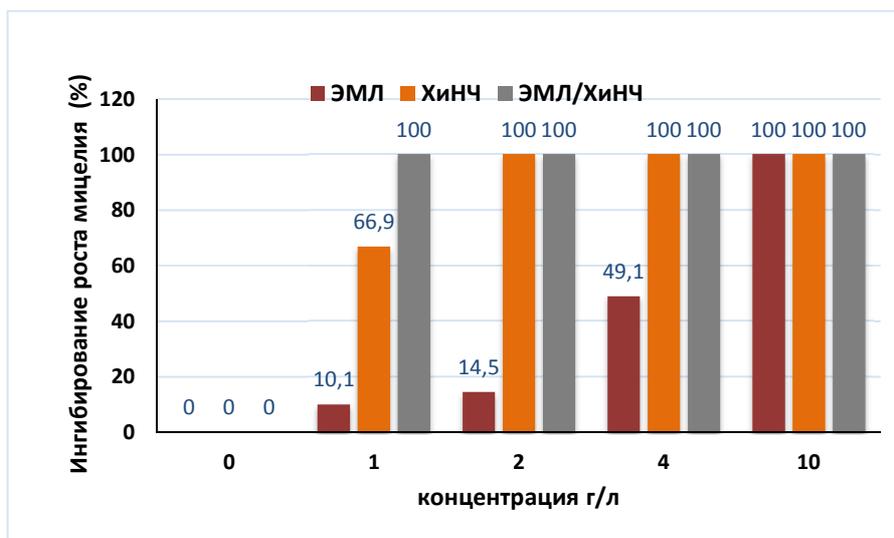


Рисунок 2 - Эффективность эфирного масла лаванды (ЭМЛ), наночастицы хитозана (ХиНЧ), и масло лаванды инкапсулированное наночастицами хитозана (ЭМЛ/ХиНЧ) в отношении *Alternaria alternata* (*in vitro*).

Эти результаты согласуются с подобными исследованиями [5], показали что наноинкапсулирование привело к лучшему антифунгальной эффективности эфирных масел *Cinnamomum zeylanicum* при меньшем количестве. Как показали исследования, улучшенные характеристики эфирного масла, инкапсулированного наночастицами хитозана, обусловлено сохранностью от летучести эфирных масел и тем, что наноинкапсулирование хорошо сохраняет масла в среде. Кроме того, медленное высвобождение сохраненных летучих соединений из наночастиц во время опыта приводит к лучшему ингибирующему эффекту, а также к повышению ингибирующего эффекта самих наночастиц хитозана.

Результаты биологической эффективности инкапсулированного и свободного эфирного масла при защите картофеля от альтернариозная гнили методом искусственного заражения клубней картофеля предоставленные на рисунке 3. Установлено, что все обработок показали достоверных различий по

сравнению с контролем. Масло лаванды инкапсулированное нанохитозаном в норме 10 г/т существенно снижало индекс поражения (степень развития болезни) и являлся наиболее эффективным. Биологическая эффективность составляла 91,7% (рис. 3).

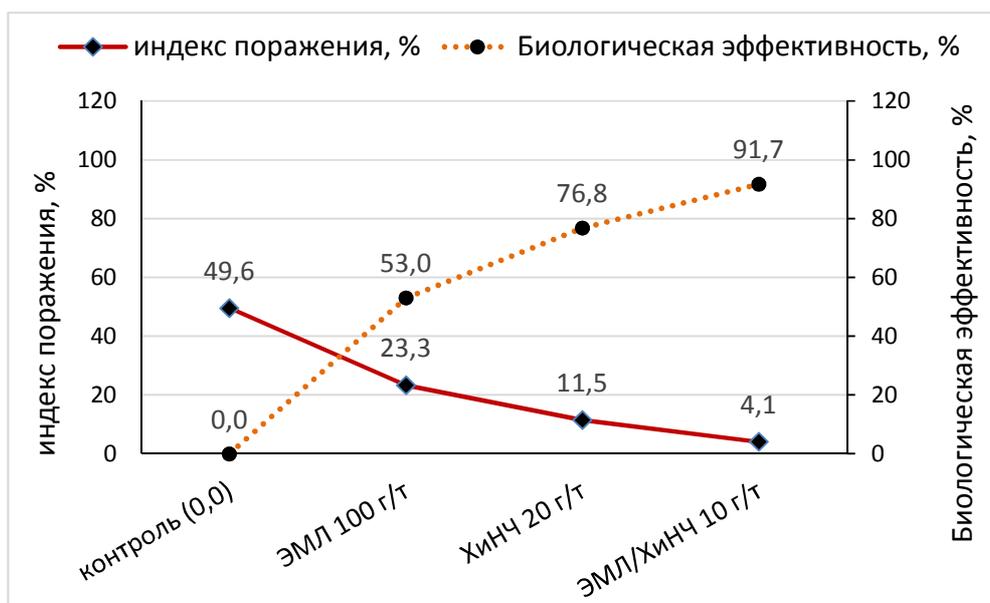


Рисунок 3 - Биологическая эффективность инкапсулированного (ЭМЛ/ХиНЧ), свободного (ЭМЛ) эфирного масла лаванды, и нанохитозана (ХиНЧ) при защите картофеля от альтернариозная гнили методом искусственного заражения, $НСР_{0,05}$ (биологическая эффективность) = 5,97

Хитозан в сочетании с эфирным маслом *Cinnamomum zeylanicum* продемонстрировал сильную антифунгальную активность в отношении *Phytophthora drechsleri*, возбудителя плодовой гнили огурцов, в лабораторных условиях и при нанесении в качестве покрытия на огурцы. Mohammadi et al., (2015) [5] обнаружили, что инкапсулированное масло *Cinnamomum zeylanicum* при концентрации 1,5 г/л значительно снижали как степень заболевания, так и распространенности болезни огурцов, зараженных фитопфторой. Однако

свободное эфирное масло снизило распространенность болезни на 75,84% по сравнению с контролем [5].

Заключение. Доказана перспективность метода ионного гелеобразования для синтеза нанопрепарата лавандового масла с нанохитозаном и его использования для защиты клубней картофеля от альтернариозной гнили. В результате исследования было получено нанопрепарата лавандового масла с диапазоном размера 130–490 нм методом ионного гелеобразования с хитозаном. Превосходящая биологическая эффективность инкапсулированного масла лаванды по сравнению со свободным маслом или чистым нанохитозаном была продемонстрирована. Инкапсулированное масло в норме 10 г/т значительно снизило индекс поражения клубней картофеля в течение 21 дня. Биологическая эффективность составляла 91,7%. В дальнейших исследованиях предлагается оценить эффективность использования нанопрепарата лавандового масла в качестве природного средства для защиты клубней картофеля от комплекса возбудителей болезней в период хранения при температуре 4–5 °С.

Благодарности. Автор Е.М.З. финансировался за счет стипендии по программе между Египтом и Р.Ф. Авторы хотели бы поблагодарить Региональный школьный технопарк Астраханской области за техническую поддержку в завершении этой работы.

Литература

1. Wharton P. et al. Early Blight // Michigan Potato Diseases. 2007. Vol. extension, № May. P. 6.
2. Troncoso-Rojas R., Tiznado-Hernández M.E. *Alternaria alternata* (Black Rot, Black Spot) // Postharvest Decay Control Strateg. Academic Press, 2014. P. 147–187.
3. Mohammed S.R., Eskov I.D., Zeitar E.M. Combined Influence of Chitosan and Calcium Chloride on Fusarium Dry Rot Disease Under Field Conditions // Open Agric. J. Bentham Science Publishers Ltd., 2020. Vol. 14, № 1. P. 339–344.

4. Hedges C. et al. Antifungal activity and control of the early blight in tomato through tea tree essential oil // *Crop Prot.* Elsevier, 2021. Vol. 148. P. 105728.
5. Mohammadi A., Hashemi M., Hosseini S.M. Chitosan nanoparticles loaded with *Cinnamomum zeylanicum* essential oil enhance the shelf life of cucumber during cold storage // *Postharvest Biol. Technol.* Elsevier, 2015. Vol. 110. P. 203–213.
6. Keawchaoon L., Yoksan R. Preparation, characterization and in vitro release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles // *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* Elsevier, 2011. Vol. 84, № 1. P. 163–171.
7. EM Zeitar, LT Sukhenko S.M. Tea tree essential oil induces resistance against tuber rot caused by *Alternaria alternata* during potato storage // *J. Agric. Environ.* 2023. Vol. 6, № 34. P. 1–7.
8. Logan C., Khan A.A. Comparative studies of *Phoma* spp. associated with potato gangrene in Northern Ireland // *Trans. Br. Mycol. Soc.* 1969. Vol. 52, № 1. P. 9–17.
9. Ammar N. et al. Extracts from the Brown Macroalga *Sargassum vulgare* for Postharvest Suppression of Potato *Fusarium Dry Rot* // *Nat. Prod. Chem. Res.* OMICS Publishing Group, 2018. Vol. 06, № 04.
10. Hosseini S.F. et al. Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and in vitro release study // *Carbohydr. Polym.* Elsevier, 2013. Vol. 95, № 1. P. 50–56.