# زیست سنتز سبز و مشخصه‌یابی نانوذرات مس با بهره‌گیری از عصاره گیاه استبرق (*Calotropis procera*): پتانسیل سنجی به عنوان نانو-قارچ کش علیه *Alternaria alternata*

**مهرداد بابابربیع[۱*]، آتوسا دانیائی[۲]، لیلا عامری[۳]، مهتاب هادیان[۳]، محدثه زرنگاری[۳]، کیمیا کمالی[۳]، الهام رحیمی[۳]،**

۱-گروه کشاورزی، مجتمع آموزش عالی میناب، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.

۲-دانشگاه ملی مهارت، تهران، ایران.

۳- دبیرستان دخترانه فرزانگان نور میناب، اداره آموزش و پرورش شهرستان میناب، میناب، ایران.

## چکیده

مدیریت بیماری‌های قارچی به‌ویژه ناشی از *Alternaria alternata* به دلیل خسارات اقتصادی گسترده و محدودیت‌های زیست‌محیطی کاربرد قارچ‌کش‌های شیمیایی، نیازمند رویکردهای جایگزین کارآمد و ایمن است. یکی از راهکارهای نوین، سنتز سبز نانوذرات فلزی با استفاده از عصاره‌های گیاهی است. در این مطالعه، دو تیمار شامل «نانوذرات مس سنتزشده با عصاره آبی گیاه استبرق» و «نانوذرات مس سنتزشده با عصاره هیدروالکلی گیاه استبرق» تهیه و مقایسه شدند. شناسایی مورفولوژی و اندازه ذرات با میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) نشان داد میانگین قطر نانوذرات هر دو تیمار ۴۸ □نانومتر و شکل عمدتاً کروی است. فعالیت ضدقارچی این نانوذرات علیه *A. alternata* (سویه PTCC 5224) به روش رقیق‌سازی سریالی در محیط PDB برای تعیین حداقل غلظت مهارکننده رشد (MIC) و در محیط PDA برای تعیین حداقل غلظت کشنده (MBC) ارزیابی شد. هر دو تیمار دارای MIC برابر ۵۰□میلی‌گرم□بر□میلی‌لیتر بودند. مقدار MBC برای نانوذرات مس سنتزشده با عصاره آبی برابر ۶۰□میلی‌گرم□بر□میلی‌لیتر و برای نانوذرات مس سنتزشده با عصاره هیدروالکلی برابر ۷۳,۳□±□۵,۸□میلی‌گرم□بر□میلی‌لیتر به‌دست آمد. نتایج نشان داد که هر دو نوع نانوذره خاصیت مهاری قابل توجهی بر رشد قارچ دارند و نمونه با عصاره آبی توانایی مهار کامل رشد را در غلظت کمتری نشان داد. این یافته‌ها قابلیت استفاده از نانوذرات مس سنتزشده به روش سبز با عصاره گیاه استبرق را به‌عنوان گزینه‌ای زیست‌سازگار و مؤثر برای توسعه قارچ‌کش‌های زیستی در مدیریت پایدار بیماری‌های قارچی گیاهان پیشنهاد می‌کند.

***واژه‌های کلیدی:*** *آلترناریا، سنتز سبز، عصاره گیاهی، گیاه Calotropis procera، محیط زیست، نانوذرات مس*

**ایمیل نویسنده مسئول:** mehrdad.babarabi@hormozgan.ac.ir

تاریخ دریافت : ۱۴۰۵/۰۳/۰۲ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۵/۰۵/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۷/۰۳

## ۱.مقدمه

کنترل بیماری‌های قارچی یکی از چالش‌های اساسی در تولیدات کشاورزی است؛ قارچ‌های گیاهی می‌توانند موجب کاهش قابل‌توجه عملکرد محصول، افت کیفیت پس از برداشت و افزایش هزینه‌های مدیریتی شوند، به‌طوری‌که در بسیاری از سیستم‌های زراعی خسارت‌های اقتصادی عظیمی به همراه دارند [۱]. به منظور کاهش اثرات زیان‌بار این عوامل پاتوژن، روش‌های متنوعی از جمله کنترل شیمیایی، بیولوژیک و مدیریتی به‌کار گرفته می‌شوند؛ با این حال، نگرانی‌ها درباره مقاومت آفات نسبت به قارچ‌کش‌های شیمیایی، اثرات زیست‌محیطی و خطرات سلامت انسان، انگیزه پژوهشگران را برای یافتن راهکارهای پایدارتر و سازگارتر با محیط زیست افزایش داده است [۲], [۳]. در این زمینه، استفاده از ترکیبات طبیعی شامل عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی به‌عنوان عوامل ضدقارچیِ جایگزین یا تکمیلی مورد توجه فزاینده‌ای قرار گرفته است، زیرا بسیاری از این ترکیبات شامل مولکول‌های زیستی با طیف فعالیتی گسترده، سمیت نسبتاً پایین برای جانداران غیرهدف و قابلیت تجزیه محیطی مناسب هستند [۴].

استفاده از عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی، به‌ویژه گونه‌های بومی هر منطقه، دارای مزایای ویژه‌ای است: گیاهان بومی معمولاً با شرایط اقلیمی و خاکی محلی سازگارترند و در دسترس بودن، هزینه تولید کمتر و پایداری بیشتر را فراهم می‌کنند؛ علاوه بر این، ترکیب فیتوشیمیایی اختصاصی گونه‌ها می‌تواند فعالیت‌های ضدپاتوژنی منحصربه‌فردی ارائه دهد که در مهار پاتوژن‌های محلی مؤثرتر باشد [۵]. به‌همین دلیل، پژوهش‌های متعددی به بررسی کارایی عصاره‌های گیاهی محلی در مهار قارچ‌ها و باکتری‌های گیاهی پرداخته و نتایج امیدوارکننده‌ای گزارش کرده‌اند؛ مطالعه‌هایی نشان داده‌اند که عصاره‌های آبی یا آلی گیاهان بومی می‌توانند رشد و توسعه قارچ‌های پاتوژن را کاهش دهند و در برخی موارد از تجمع اسپور یا تولید متابولیت‌های سمی قارچی نیز جلوگیری کنند [۶], [۷].

گیاه استبرق (*Calotropis procera*) به‌عنوان یک گونه خشکی‌پسند و پهن‌برگ از خانواده Apocynaceae در مناطق گرمسیری و نیمه‌خشک توزیع دارد و به‌ویژه در جنوب ایران و نواحی گرم و نیمه‌خشک قابل رویش است [۸]. این گونه به دلیل تحمل بالا در برابر تنش‌های محیطی مانند خشکی، شوری و خاک‌های فقیر شناخته می‌شود و از دیرباز در طب سنتی و کاربردهای صنعتی محلی استفاده شده است [۹]. مطالعات فیتوشیمیایی روی *C. procera* نشان داده‌اند که این گیاه حاوی ترکیبات فعالی مانند فلاونوئیدها، ترکیبات فنولی، استرول‌ها و گلیکوزیدهای خاص است که خواص ضدباکتریال، ضدالتهابی و گاهی ضدقارچی از خود نشان داده‌اند [۱۰], [۱۱]. بدین ترتیب، استبرق به‌واسطهٔ ترکیب فیتوشیمیایی غنی و دسترسی بالا در مناطق گرمسیری، یک منبع بالقوه برای تهیه عصاره‌های ضدقارچ قابل‌مطالعه و کاربردی در کشاورزی پایدار تلقی می‌شود [۱۰].

قارچ‌های جنس Alternaria، از جمله *Alternaria alternata*، از پاتوژن‌های مهم گیاهی هستند که طیف گسترده‌ای از میزبان‌ها (محصولات زراعی و باغی) را مبتلا می‌کنند و باعث لکه‌های برگ، پوسیدگی میوه، کاهش فتوسنتز و در نهایت افت عملکرد می‌گردند [۱۲], [۱۳]. علاوه بر خسارت‌های زراعی، بسیاری از گونه‌های *Alternaria* توانایی تولید مایکوکسین‌ها را دارند که می‌تواند بر کیفیت محصول و ایمنی زنجیره غذایی تأثیر منفی بگذارد [۱۴]. کنترل مؤثر *Alternaria* با روش‌های کم‌آسیب به محیط، به‌خصوص در محصولات حساس، یک ضرورت مدیریتی است که پژوهش‌های نوین در این حوزه را تشویق می‌کند.

در سال‌های اخیر، توسعه نانوتکنولوژی زیستی (green nanotechnology) روش جدیدی را برای تقویت کارایی عوامل طبیعی ارائه کرده است؛ یکی از رویکردهای موفق، سنتز نانوذرات فلزی با استفاده از عصاره‌های گیاهی است که به «سنتز سبز» معروف است [۱۵], [۱۶]. نانوذرات تهیه‌شده با این روش اغلب دارای پوشش‌های آلی فیتوشیمیایی منشاء گیاهی هستند که می‌تواند پایداری، توزیع اندازه و خواص سطحی ذرات را تنظیم کرده و اثربخشی زیستی آنها را تحت تأثیر قرار دهد [۱۷]. گزارش محققین نشان داد که نانوذرات نقره سنتزشده از گیاه شنبلیله منجر به افزایش فعالیت ضد باکتریایی شد [۱۸].

نانوذرات مس (CuNPs) به‌ویژه به‌خاطر خواص ضدمیکروبی و هزینه نسبتاً پایین مورد توجه‌اند؛ گزارش‌ها نشان می‌دهد که CuNPs می‌توانند رشد قارچ‌ها را از طریق مکانیسم‌هایی مانند تماس فیزیکی، نفوذ در ساختار سلولی، تولید گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن و آزادسازی یون‌های مس مهار کنند [۱۹]. هنگامی که سنتز CuNPs با عصاره‌های گیاهی انجام می‌شود، پوشش مولکولی ناشی از عصاره می‌تواند اثرات هم‌افزا یا تعدیل‌کننده بر فعالیت ضدقارچی داشته باشد و در عین حال زیست‌سازگاری و پایداری ذرات را افزایش دهد [۲۰]. با توجه به ظرفیت استبرق برای رشد در شرایط نامساعد، وفور در مناطق گرمسیری جنوب ایران و وجود ترکیبات فیتوشیمیایی فعال در این گیاه، سنتز نانوذرات مس با استفاده از عصارهٔ استبرق می‌تواند راهبردی پایدار برای تولید عوامل ضدقارچی باشد که هم از منابع محلی بهره می‌برد و هم آثار زیست‌محیطی کمتری نسبت به قارچ‌کش‌های سنتتیک دارد. همچنین، استفاده از یک گونهٔ مقاوم و کم‌آب‌خواه مانند *C. procera* امکان تولید ماده اولیه در شرایط خشکی و شوری را فراهم می‌کند و لذا برای مناطق با منابع محدود کشاورزی گزینه عملی و مقرون‌به‌صرفه‌ای ارائه می‌دهد [۲۱].

هدف این پژوهش بررسی توانایی عصاره‌های استبرق در سنتز نانوذرات مس به‌روش سبز و ارزیابی فعالیت ضدقارچی این نانوذرات در برابر *Alternaria alternata* است. به‌ویژه، پژوهش تلاش می‌کند نشان دهد که آیا نانوذرات مس سنتزشده با عصاره آبی و هیدروالکلی *C. procera* می‌توانند به‌طور مؤثر رشد و بقا این پاتوژن را در شرایط آزمایشگاهی مهار کنند و تفاوت‌های احتمالی ناشی از نوع عصاره در فعالیت ضدقارچی را مشخص سازد؛ نتایج این پژوهش می‌تواند زمینه استفاده عملی از یک گیاه بومی، مقاوم و با دسترسی محلی را برای توسعه قارچ‌کش‌های زیستی مبتنی بر نانوذرات فراهم آورد.

## ۲. مواد و روش‌ها

### ۲-۱- جمع‌آوری و آماده‌سازی گیاه

گیاه استبرق (*Calotropis procera*) از منطقه میناب (استان هرمزگان، ایران) جمع‌آوری شد و پس از تأیید شناسایی توسط گیاه‌شناس، بخش‌های هوایی گیاه در سایه و در دمای محیط خشک گردید. ماده خشک‌شده به کمک آسیاب آزمایشگاهی پودر شد و در ظروف تیره و در دمای محیط تا زمان استفاده نگهداری گردید.

### ۲-۲- تهیه عصاره‌ها

فرایند تهیه عصاره‌های آبی و هیدروالکلی با اقتباس از روش Manikandan et al., 2020 و تغییرات جزئی انجام شد:

عصاره آبی: ۱۰۰ گرم از پودر گیاه خشک‌شده با ۹۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد. مخلوط به‌مدت ۲۴ ساعت روی شیکر دورانی (۱۵۰ rpm) در دمای محیط قرار داده شد، سپس با سانتریفیوژ (۴۰۰۰ دور در دقیقه، ۱۰ دقیقه) رسوب جدا و محلول رویی (عصاره) جمع‌آوری گردید [۲۲].

عصاره هیدروالکلی: به‌همین شیوه ۱۰۰ گرم پودر گیاه با ۹۰۰ میلی‌لیتر حلال مخلوط شامل ۷۰٪ اتانول و ۳۰٪ آب مقطر تیمار شد. پس از شیکر و سانتریفیوژ مشابه روش بالا، محلول جمع‌آوری‌شده بوسیله دستگاه روتاری اواپراتور در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد تغلیظ گردید [۲۲].

### ۲-۳- سنتز نانوذرات مس

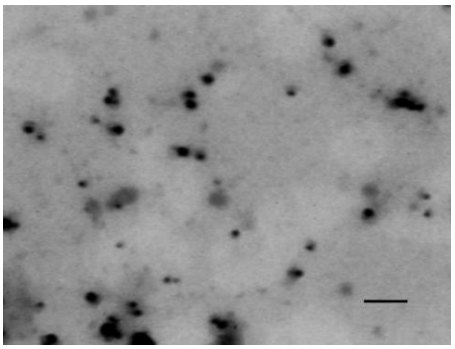
سنتز نانوذرات مس با اقتباس از Nieto-Maldonado et al., 2022 انجام شد. محلول سولفات مس ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) با غلظت ۱ میلی مولار به‌طور تدریجی به هر یک از دو نوع عصاره (آبی و هیدروالکلی) افزوده شد و مخلوط به‌مدت ۲۴ ساعت روی شیکر میله‌ای (۱۵۰ rpm) در دمای محیط و در تاریکی (پوشیده با فویل آلومینیومی) نگهداری شد [۲۳]. تغییر رنگ محلول از سبز به قهوه‌ای به‌عنوان شاخص اولیه تشکیل نانوذرات در نظر گرفته شد (شکل۱).



**شکل۱- تغییر رنگ عصاره برگ گیاه استبرق قبل و پس از سنتز نانورات مس از آن.**
**سمت چپ: قبل از سنتز. سمت راست: بعد از سنتز.**

### ۲-٤- شناسایی نانوذرات

برای بررسی اندازه و مورفولوژی، نمونه‌ها با میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) آنالیز شدند. قطره‌ای از سوسپانسیون رقیق‌شده نانوذرات بر روی شبکه‌های کربنی مسی قرار داده شد و پس از خشک شدن در دمای محیط، تصاویر TEM ثبت گردید. نتایج نشان داد میانگین اندازه ذرات ۴۸ نانومتر بوده، شکل عمدتاً کروی و توزیع اندازه نسبتاً یکنواخت داشته‌اند (شکل۲).



**شکل۲- تصویر میکروسکوپ الکترونی (TEM) نانوذرات مس سنتزشده از عصاره گیاه استبرق**

### ۲-۵- آزمون حداقل غلظت مهارکننده رشد (MIC) و حداقل غلظت کشنده (MFC)

آزمایش MIC و MFC علیه قارچ Alternaria alternata (PTCC 5224)) براساس پروتکل CLSI و با اصلاحات مطابق شرایط آزمایشگاهی انجام شد. سوسپانسیون اسپور کپک با غلظت $10^6$ اسپور/میلی‌لیتر تهیه شد.

بعد از کشت ۷ روزه کپک مورد در محیط کشت PDA، کشت فعال از کپک اشاره شده آماده سازی شد. در ادامه محیط کشت PDA آگار دار وPDB مایع داخل پلیت و فلاسک آزمایش آماده استریل شد. به منظور تهیه محیط های آگار دار مقدار ۲۰ گرم در لیتر آگار به محیط اضافه شد. همه محیط ها در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه استریل و سپس به پتری دیش های استریل منتقل شدند. بعد از آماده سازی کشت جوان و فعال از کپک به منظور انجام آزمون از محلول استریل سرم فیزیولوژی همراه با ۰/۱ درصد توئین ۸۰ استریل جهت شستشو و محلول سازی اسپورهای کپک استفاده شد. از اسپورهای کپکی با غلظت ۱۰۶ اسپور در میلی لیتر به عنوان مایه تلقیح میکروبی جهت انجام آزمون استفاده شد. در ادامه محیط PDA اگاردار و PDB مایع داخل پلیت و لوله آزمایش آماده استریل شد. به منظور انجام آزمون سنجش MIC و MBC انجام شد.

برای آزمایش MIC، رقت‌های سریالی از غلظت ۱۰۰ تا ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از هر نمونه (نانوذرات مس سنتزشده با عصاره آبی و هیدروالکلی) در محیط کشت PDB آماده گردید. هر رقت با ۲۵ میکرولیتر سوسپانسیون اسپور مخلوط و سپس به‌مدت ۴۸–۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد انکوبه شد. تغییر رنگ با معرف تترازولیوم کلرید (۵mg/ml) بررسی گردید و آخرین غلظتی که تغییر رنگ به صورتی مشاهده نشد، به‌عنوان MIC در نظر گرفته شد.

برای تعیین MFC، از رقت‌های بالاتر از MIC بر روی محیط آگار PDA کشت انجام شد. غلظتی که رشد قابل مشاهده قارچ را متوقف کرد به‌عنوان MFC گزارش گردید.

## ۳. تجزیه و تحلیل نتایج

### ۳-۱- یافته‌ها

**جدول ۱. نتایج MIC و MBC برای نانوذرات مس سنتزشده با عصاره آبی گیاه استبرق و نانوذرات مس سنتزشده با عصاره هیدروالکلی گیاه استبرق علیه *Alternaria alternata* (PTCC5224).**

| Sample | MIC (mg mL−1( | MBC (mg mL−1( |
|---|---|---|
| Copper nanoparticles synthesized using aqueous extract of *Calotropis procera* | 50 (n=3) | 60, 60, 60⟶60 (n=3, σ=0) |
| Copper nanoparticles synthesized using hydroalcoholic extract of *Calotropis procera* | 50 (n=30) | 70, 80, 70⟶73.3±5.8 (n=3) |

**جدول ۲. خلاصه آماری تکمیلی (میانگین، انحراف معیار، n، دامنه) برای MIC و MBC (واحد: mg mL−1)**

| Parameter | Sample | n | Mean | SD | Min–Max |
|---|---|---|---|---|---|
| MIC | Cu NPs / Aqueous extract of *C. procera* | 3 | 50.0 | 0.0 | 50-50 |
| MIC | Cu NPs / Hydroalcoholic extract of *C. procera* | 3 | 50.0 | 0.0 | 50-50 |
| MBC | Cu NPs / Aqueous extract of *C. procera* | 3 | 60.0 | 0.0 | 60-60 |
| MBC | Cu NPs / Hydroalcoholic extract of *C. procera* | 3 | 73.3 | 5.8 | 70-80 |

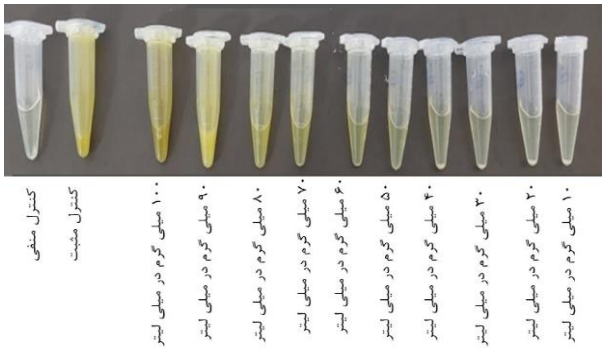
n = تعداد تکرارها (n = 3).

SD = انحراف معیار. برای مقادیری که در همه تکرارها یکسان بودند (مثلاً MIC = 50 برای همه تکرارها)، SD صفر است.

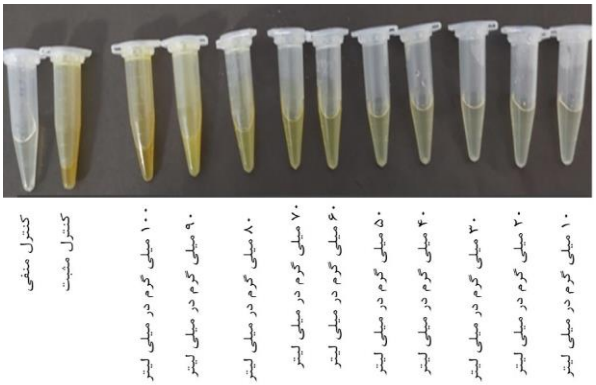
دامنه (Min–Max) کمترین و بیشترین مقدار ثبت‌شده در تکرارها را نشان می‌دهد.

## ۳-۲- نتایج

نتایج نشان می‌دهند که هر دو نمونه در غلظت ۵۰ mg mL−1 اثر مهاری قابل‌توجهی بر رشد *A. alternata* دارند؛ اما نمونه تهیه‌شده با عصاره آبی (نمونه حاصل از عصاره آبی) دارای MBC پایین‌تری نسبت به نمونه هیدروالکلی بوده که نشان‌دهنده کارایی بالاتر در القای اثر کشندگی در غلظت پایین‌تر است. تصاویر ۳ و ۴ به ترتیب نشان¬دهنده نتایج مربوط به عصاره سنتزشده هیدروالکلی و آبی است.




**شکل۳- تیمار نانوذرات سنتزشده از عصاره هیدروالکلی گیاه استبرق بر قارچ آلترناریا.**




**شکل٤- تیمار نانوذرات سنتزشده از عصاره آبی گیاه استبرق بر قارچ آلترناریا.**

## ٤. نتیجه گیری

در این مطالعه نانوذرات مس سنتزشده با عصاره آبی گیاه استبرق و نانوذرات مس سنتزشده با عصاره هیدروالکلی گیاه استبرق هر دو توانستند رشد قارچ *Alternaria alternata* را در غلظت ۵۰ $mg{\cdot}mL^{-1}$ مهار کنند ( MIC = 50 $mg{\cdot}mL^{-1}$) و در غلظت‌های بالاتر به ترتیب موجب کشندگی قارچ شدند؛ نمونه هیدروالکلی در ۶۰ $mg{\cdot}mL^{-1}$ و نمونه آبی در محدوده ۷۰–۸۰ $mg{\cdot}mL^{-1}$ موجب از بین رفتن رشد قارچ شدند. این نتایج نشان می‌دهد فعالیت ضدقارچی اولیه هر دو نمونه مشابه است اما توان کشندگی نهایی نمونه هیدروالکلی کمی قوی‌تر از نمونه آبی است (هیدروالکلی: MBC = 60 $mg{\cdot}mL^{-1}$؛ آبی: MBC ≈ 73.3 $mg{\cdot}mL^{-1}$ میانگین). چنین اختلافی ممکن است ناشی از تفاوت در پوشش سطحی نانوذرات، ترکیب شیمیایی فیتوشیمیایی عصاره‌ها و در نتیجه تفاوت در پایداری ذرات یا نرخ آزادسازی یون‌های Cu2+ باشد [۲۴]. پوشش‌های مولکولی حاصل از عصاره‌ها می‌توانند بر جذب سطحی ذرات، واکنش‌های سطحی و تعامل با دیواره سلولی قارچ اثر بگذارند و بنابراین بر اثر زیستی نهایی مؤثر باشند.

اندازه ذرات که در آنالیز TEM 48 نانومتر گزارش شد در محدوده‌ای است که نسبت سطح به حجم بالا بوده و تماس بیشتری با ساختارهای سطحی سلولی فراهم می‌آورد؛ این عامل معمولاً با افزایش فعالیت ضدقارچی مرتبط است زیرا ذرات کوچک‌تر می‌توانند تماس فیزیکی و نفوذ به نزدیک

غشا را افزایش دهند و نیز نرخ آزادسازی یون را تسهیل کنند. علاوه بر اثرات ذره‌ای، آزادسازی یون مس و تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) دو مکانیسم مهم در سمیت نانوذرات مس هستند که در مطالعات پیشین نیز مطرح شده‌اند؛ تعامل مکانیکی ذرات با دیواره یا غشای سلولی، اختلال در انتقال الکترون غشایی، ایجاد تنش اکسیداتیو و نهایتاً آسیب به اجزای حیاتی سلولی از جمله پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌تواند باعث مرگ قارچ گردد [۲۵]. بر این اساس، تفاوت مشاهده‌شده در MBC بین نمونه آبی و نمونه هیدروالکلی می‌تواند نشان‌دهنده تفاوت در نسبت اثر ذره‌ای به اثر یونی یا در نرخ القای ROS باشد.

نتایج حاضر با گزارش‌های متعدد دیگری که نشان داده‌اند نانوذرات مس سنتزشده به‌صورت سبز (با استفاده از عصاره‌های گیاهی) فعالیت ضدقارچی قابل‌توجهی علیه گونه‌های گیاه‌پاتوژن از جمله *Alternaria spp.* نشان می‌دهند، همخوانی دارد [۲۰], [۲۶]. مطالعات مقایسه‌ای نشان داده‌اند که نوع عصاره مؤثر بر اندازه و پوشش سطحی ذرات است و در نتیجه بر فعالیت ضدقارچی تأثیرگذار است؛ برای مثال عصاره‌های متفاوت می‌توانند موجب تشکیل ذرات با اندازه، پایداری و گروه‌های عاملی سطحی متفاوت شوند که این تفاوت‌ها در اثر زیستی منعکس می‌شود [۲۷]. بنابراین، یافته‌ی ما که عصاره آبی دارای MBC پایین‌تری نسبت به نمونه عصاره هیدروالکلی است، مطابق با این الگو قابل توجیه است و نیاز به تحلیل بیشتر ترکیبات فیتوشیمیایی هر عصاره و نقش آن‌ها در پوشش‌دهی ذرات را نشان می‌دهد.

در یک پژوهش جامع اخیر گزارش شده است که نانوذرات اکسید مس سنتزشده با عصاره‌های گیاهی نه‌تنها اندازه و پایداری مناسبی دارند، بلکه اثرات ضدقارچی و ضدباکتریایی گسترده‌ای از خود نشان می‌دهند و می‌توانند در کشاورزی پایدار مورد استفاده قرار گیرند [۲۸]. در یک مطالعه، نانوذرات اکسید مس و روی سنتزشده به روش سبز با استفاده از عصاره پوست پرتقال (*Citrus aurantium*) فعالیت ضدقارچی قابل‌توجهی علیه *Alternaria alternate* نشان دادند و در غلظت ۲ mg/mL به طور کامل رشد قارچ را مهار کردن [۲۹]. همچنین، نانوذرات مس سنتزشده به روش سبز با عصاره‌های گیاهی در مطالعه‌ای دیگر توانستند رشد قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی از جمله *Fusarium oxysporum* و *Alternaria alternata* را به طور معنی‌داری مهار کنند که نشان‌دهنده کارایی بالای این ذرات در مدیریت بیماری‌های گیاهی است [۲۷].

برای درک بهتر مکانیسم‌های دخیل، پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی نرخ آزادسازی یون Cu2+ از هر نمونه و میزان تولید ROS در معرض قارچ اندازه‌گیری شود، زیرا مطالعات قبلی نشان داده‌اند که تفکیک اثرات ذره‌ای و یون‌محور برای تبیین مکانیسم سمیت ضروری است [۲۵]. همچنین آزمون‌های میکروبیولوژیک تکمیلی مانند بررسی آسیب غشایی (با رنگ‌آمیزی پروپیدیوم آیداید)، تعیین میزان انتشار پروتئین یا آنزیم‌های سیتوپلاسمی و تصویربرداری TEM پس از برخورد با ذرات می‌تواند اطلاعات مکانیستی بیشتری فراهم آورد.

از دیدگاه کاربردی، نتایج نشان می‌دهد نانوذرات مس زیستی تهیه‌شده با عصاره استبرق پتانسیل کاربرد به‌عنوان عوامل کنترل بیولوژیک برای کاهش رشد *Alternaria alternata* را دارند؛ اما پیش از هرگونه پیشنهاد کاربرد میدانی باید مطالعات تکمیلی درباره سمیت غیرهدف (اثرات بر گیاه میزبان و میکروارگانیسم‌های مفید خاک)، پایداری در شرایط محیطی و دوز موثر در شرایط مزرعه انجام شود [۳۰]. همچنین ارزیابی سمیت اکولوژیک و تعیین شاخص‌های ایمنی زیستی برای کاربردهای زراعی ضروری است. نوآوری مطالعه حاضر در این است که علاوه بر تأیید فعالیت ضدقارچی CuNPs سنتزشده به روش سبز، تفاوت عملکردی عصاره‌های مختلف یک گونه گیاهی (استبرق) را به‌صورت کمی مشخص کرده است؛ یافته‌ای که می‌تواند در بهینه‌سازی فرایند سنتز زیستی و انتخاب بهترین عصاره برای تولید نانوذرات با بیشترین کارایی ضدقارچی کاربرد داشته باشد.

به طور کلی، نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که هر دو روش سنتز (با عصاره آبی و هیدروالکلی) منجر به تولید نانوذرات مس با فعالیت ضدقارچی قابل‌توجه شدند؛ تفاوت‌های مشاهده‌شده در MBC احتمالاً ناشی از تفاوت‌های پوشش سطحی و رفتار سطحی ذرات است و مطالعات تکمیلی برای روشن‌سازی مکانیسم‌ها و تعیین ایمنی و کارایی در شرایط واقعی پیشنهاد می‌شود [۲۰].

## ۵. منابع


[1] Khaskheli MA, Nizamani MM, Tarafder E, Das D, Nosheen S, Muhae-Ud-Din G, et al. Sustainable management of major fungal phytopathogens in Sorghum (*Sorghum bicolor L.*) for food security: a comprehensive review. J Fungi. 2025;11(3):207. doi: 10.3390/jof11030207.

[2] Savary S, Willocquet L, Pethybridge SJ, Esker P, McRoberts N, Nelson A. The global burden of pathogens and pests on major food crops. Nat Ecol Evol. 2019;3(3):430-9. doi: 10.1038/s41559-018-0793-y.

[3] Adkar-Purushothama CR, Chettimada A, Murali TS, Muthusamy A, Bouarab K, Perreault JP. Non-chemical control of fungal pathogens in crops: a one-health perspective on strategies, mechanisms, and future directions. Front Plant Sci. 2025;16:1746521. doi: 10.3389/fpls.2025.1746521.

[4] Vakili-Ghartavol M, Arouiee H. Harnessing plant-derived antifungal agents and nanoencapsulation for postharvest pathogen management: A comprehensive review. J Agric Food Res. 2025;102280. doi: 10.1016/j.jafr.2025.102280.

[5] Leiva-Mora M, Bustillos D, Arteaga C, Hidalgo K, Guevara-Freire D, López-Hernández O, et al. Antifungal mechanisms of plant essential oils: A comprehensive literature review for biofungicide development. Agriculture. 2025;15(21):2303. doi: 10.3390/agriculture15212303.

[6] Bouyo T, Koukoura KK, Salifou ST, Pissang P, Gbekley EH, Hoekou Y, et al. Phytochemical profile and bioactivities of hydroethanolic extracts of Pteleopsis suberosa and Piliostigma thonningii used in traditional medicine in Togo. Sci Rep. 2026; [Epub ahead of print]. doi: 10.1038/s41598-026-59482-y.

[7] Aznar D, Colas De La Noue A, Bidel LPR, Cayzac C, Poss C, Ciordia E, et al. In vitro screening of the antifungal and antimycotoxin effects of a stilbenoids-riche grapevine cane extract on *Fusarium graminearum*, *Aspergillus flavus* and *Penicillium expansum*. Toxins (Basel). 2025;17(9):454. doi: 10.3390/toxins17090454.

[8] Bhardwaj GS, Jain A, Jangid T, Jangir RN, Sharma A. *Calotropis procera*: A comprehensive review of its phytochemistry, ethnomedicinal uses, and pharmacological potential. S Afr J Bot. 2025;185:235-76. doi: 10.1016/j.sajb.2025.08.001

[9] Nchimbi HY. Ethnopharmacology of Calotropis procera: Traditional knowledge and scientific insights from Dodoma Region, Tanzania. Adv Integr Med. 2025;12(4):100535.

[10] Yirgashewa A, Ameha K, Manikandan M. Biological Efficiency of Calotropis procera Extracts Against the Growth of Selected Fungal Plant Pathogens for Sustainable Agroecosystem Development. Arab J Plant Prot. 2025;43(1):126. doi: 10.22268/AJPP-001291

[11] Singh NK, Bhushan B, Agrahari Y. An overview on the phytochemical and therapeutic potential of *Calotropis procera*. Pharmacol Res - Mod Chin Med. 2024;11:100441. doi: 10.1016/j.prmcm.2024.100441

[12] Schmey T, Tominello-Ramirez CS, Brune C, Stam R. *Alternaria diseases* on potato and tomato. Mol Plant Pathol. 2024;25(3):e13435. doi: 10.1111/mpp.13435.

[13] Kumar V, Anal AKD, Rai S, Nath V. Leaf, panicle and fruit blight of litchi (*Litchi chinensis*) caused by *Alternaria alternata* in Bihar state, India. Can J Plant Pathol. 2018;40(1):84-9. doi: 10.1080/07060661.2017.1401005.

[14] Logrieco A, Moretti A, Solfrizzo M. *Alternaria* toxins and plant diseases: an overview of origin, occurrence and risks. World Mycotoxin J. 2009;2(2):129-40. doi: 10.3920/WMJ2009.1145.

[15] Kour B, Kaushik S, Sekar T. Plant-mediated green synthesis of metal-based nanomaterials and their potent environmental applications: A review. Inorg Chem Commun. 2025;116045. doi: 10.1016/j.inoche.2025.116045.

[16] Mohammadi-Aghdam S, Ahmadi O. Optimizing the green synthesis formulation of silver nanoparticles using Cherry tree leaf extract and evaluation its stability. Nanomeghyas. 2023;10(2):54-69. doi: 20.1001.1.24235628.1402.10.2.7.0.

[17] Singaravelu S, Motsoene F, Abrahamse H, Dhilip Kumar SS. Green-synthesized metal nanoparticles: a promising approach for accelerated wound healing. Front Bioeng Biotechnol. 2025;13:1637589. doi: 10.3389/fbioe.2025.1637589.

[18] Ghannadnia M, Mousavi J. Biologicalsynthesis and antibacterial effect ofsilver nanoparticles using Trifoliumresupinatumand Trigonella foenum-graecum seeds during germination stage under cold treatment. Nanomeghyas. 2021;8(1):89-100. magiran.com/p2266255

[19] Slavin YN, Bach H. Mechanisms of antifungal properties of metal nanoparticles. Nanomaterials. 2022;12(24):4470. doi: 10.3390/nano12244470.

[20] Ouda SM. Antifungal activity of silver and copper nanoparticles on two plant pathogens, *Alternaria alternata* and *Botrytis cinerea*. Res J Microbiol. 2014;9(1):34. doi: 10.3923/jm.2014.34.42.

[21] Ahmad Nejhad A, Alizadeh Behbahani B, Hojjati M, Vasiee A, Mehrnia MA. Identification of phytochemical, antioxidant, anticancer and antimicrobial potential of

indica leaves. Mater Chem Phys. 2018;213:44-51. doi: 10.1016/j.matchemphys.2018.04.007.

[27] Truong HT, Nguyen LCT, Quang Le L. Synthesis and antifungal activity of copper nanoparticles against Fusarium oxysporum pathogen of plants. Mater Res Express. 2023;10(6):65001. doi: 10.1088/2053-1591/acdb34.

[28] Bouafia A, Laouini SE, Ouahrani MR. A review on green synthesis of CuO nanoparticles using plant extract and evaluation of antimicrobial activity. Asian J Res Chem. 2020;13(1):65-70. doi: 10.5958/0974-4150.2020.00014.0.

[29] Albrahim JS, Saleh AK, Abdalla OA, El-Gendi H. *Citrus aurantium* peel extract mediated green synthesis of copper oxide and zinc oxide nanoparticles: Characterization and antifungal efficacy against post-harvest spoilage of tomato fruits by locally isolated Alternaria alternata. J Clust Sci. 2025;36(4):151. doi: 10.1007/s10876-025-02874-3.

[30] Amin N, Aziz K. Copper oxide-based nanoparticles in agro-nanotechnology: advances and applications for sustainable farming. Agric Food Secur. 2025;14(1):7. doi: 10.1186/s40066-025-00530-7.

*Calotropis procera* leaf aqueous extract. Sci Rep. 2023;13(1):14716. doi: 10.1038/s41598-023-42086-1.

[22] Manikandan DB, Arumugam M, Veeran S, Sridhar A, Krishnasamy Sekar R, Perumalsamy B, et al. Biofabrication of ecofriendly copper oxide nanoparticles using *Ocimum americanum* aqueous leaf extract: analysis of in vitro antibacterial, anticancer, and photocatalytic activities. Environ Sci Pollut Res Int. 2021;28(26):33927-41. doi: 10.1007/s11356-020-12108-w.

[23] Nieto-Maldonado A, Bustos-Guadarrama S, Espinoza-Gomez H, Flores-López LZ, Ramirez-Acosta K, Alonso-Nuñez G, et al. Green synthesis of copper nanoparticles using different plant extracts and their antibacterial activity. J Environ Chem Eng. 2022;10(2):107130. doi: 10.1016/j.jece.2022.107130.

[24] Azam A, Ahmed AS, Oves M, Khan MS, Habib SS, Memic A. Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria: a comparative study. Int J Nanomedicine. 2012;7:6003-9. doi: 10.2147/IJN.S35347.

[25] Vestergaard MC, Nishida Y, Tran LTT, Sharma N, Zhang X, Nakamura M, et al. Antifungal activity and molecular mechanisms of copper nanoforms against Colletotrichum gloeosporioides. Nanomaterials. 2023;13(23):2990. doi: 10.3390/nano13232990.

[26] Nagar N, Devra V. Green synthesis and characterization of copper nanoparticles using Azadirachta

# Green Biosynthesis and Characterization of Copper Nanoparticles Using Calotropis procera Extract: Evaluating the Nano-fungicidal Potential against Alternaria alternata

**Mehrdad Babarabie[1*],Atoosa Danyaei[2],Leila Ameri[3],Mahtab Hadian[3],Elham Rahimi[3],Kimia Kamali[3],Mohadase Zarnegari[3]**

[1]University of Hormozgan

[2]National University of skill

3 Farzanegan Girls' High School of Minab, Minab County Department of Education, Minab, Iran

Abstract:

The management of fungal diseases, particularly those caused by Alternaria alternata, requires efficient and environmentally friendly approaches due to the substantial economic losses and environmental concerns associated with chemical fungicides. One innovative strategy is the green synthesis of metal nanoparticles using plant extracts. In this study, two treatments—"copper nanoparticles synthesized using an aqueous extract of Calotropis procera" and "copper nanoparticles synthesized using a hydroalcoholic extract of Calotropis procera"—were prepared and compared. Transmission electron microscopy (TEM) revealed that the nanoparticles of both treatments had an average diameter of approximately 48 nm, spherical morphology, and relatively uniform size distribution. Antifungal activity against A. alternata (strain PTCC 5224) was assessed using a serial dilution method in potato dextrose broth (PDB) to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and on potato dextrose agar (PDA) to determine the minimum bactericidal concentration (MBC). Both treatments showed the same MIC value of 50 mg $mL^{-1}$. The MBC was 60 mg $mL^{-1}$ for the aqueous extract-derived nanoparticles and $73.3 \pm 5.8$ mg $mL^{-1}$ for the hydroalcoholic extract-derived nanoparticles. The results indicate that both types of nanoparticles exhibit significant inhibitory effects on fungal growth, with the aqueous-based sample achieving complete inhibition at a lower concentration. These findings suggest that copper nanoparticles synthesized via a green method using C. procera extract can serve as an eco-friendly and effective candidate for developing biofungicides in sustainable plant disease management.

**Keywords:** Alternaria, , Calotropis procera, Copper nanoparticles, Environment, Green synthesis, Herbal extract,

**Corresponding Author. Email:** mehrdad.babarabi@hormozgan.ac.ir

Received: 2026-05-23 Revised: 2026-08-05 Accepted: 2026-09-25