به‌زراعی کشاورزی
دوره ۱۹ ■ شماره ۴ ■ زمستان ۱۳۹۶
صفحه‌های ۹۲۰-۹۰۷

ترکیبات موجود در اسانس پوست دارچین و خاصیت ضدقارچی آن علیه قارچ‌های مولد پوسیدگی‌های میوه‌ها

سیدمسلم موسویان[۱]*، عیدی بازگیر[۲] و عارف مرادپور[۳]

۱. دانشجوی دکتری، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه لرستان، لرستان، ایران.
۲. استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه لرستان، لرستان، ایران.
۳. دانشجوی کارشناسی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه لرستان، لرستان، ایران.

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۵/۰۹/۱۳ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۱۱/۱۳

چکیده

قرن‌هاست که اسانس دارچین برای محافظت از مواد غذایی در مقابل عفونت‌های میکروبیولوژیکی کاربرد دارد و در ۱۰ سال اخیر این اسانس در بسته‌بندی‌های مواد غذایی به‌عنوان عامل ضدمیکروبی گنجانده شده است. هدف از پژوهش حاضر بررسی فعالیت ضدقارچی اسانس دارچین علیه پاتوژن‌های *Botrytis cinerea*، *Aspergillus niger* و *Penicillium digitatum* جدا شده از میوه‌های توت‌فرنگی، گوجه‌فرنگی و پرتقال در محیط داخل و بیرون آزمایشگاه است. اسانس گیاه با استفاده از دستگاه کلونجر استخراج، شناسایی و ترکیبات آن با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی و کروماتوگرافی گازی اندازه‌گیری شد. مهم‌ترین ترکیب موجود در اسانس دارچین سینامآلدهید (۸۹/۵۱ درصد) بود. حداقل غلظت بازدارندگی از رشد اسانس دارچین روی قارچ‌های *B. cinerea*، *A. niger* و *P. digitatum* در غلظت ۲۰۰ میکرولیتر در لیتر و حداقل غلظت قارچ‌کشی در غلظت ۴۰۰ میکرولیتر در لیتر برای هر سه قارچ بود. فعالیت ضدقارچی این اسانس روی دو قارچ *B. cinerea* و *A. niger* بیشتر از قارچ *P. digitatum* بود و با افزایش غلظت این خاصیت بهبود پیدا کرد. در بررسی‌های خارج از آزمایشگاه، قارچ‌های موجود در مجاورت غلظت ۶۰۰ میکرولیتر در لیتر از اسانس روی میوه‌های توت‌فرنگی، گوجه‌فرنگی و پرتقال به ترتیب ۱۱/۵۳، ۷/۳۰ و ۱۰/۱۰ درصد رشد کردند. این نتایج نشان داد که اسانس دارچین دارای پتانسیل خوبی به‌عنوان عامل ضد قارچی طبیعی برای کنترل بیماری‌های پس از برداشت میوه‌جات و سبزیجات است.

کلیدواژه‌ها: اسانس، ضدقارچی، کپک، دارچین، سینامآلدهید.

* نویسنده مسئول
Email: Moslem.moosavian@gmail.com

Archive of SID
www.SID.ir

۱. مقدمه

با توجه به بالا بودن قیمت محصول سالم و تازه میوه و سبزیجات، مدت زمان زیادی که این محصولات طول می کشد تا به دست مصرف‌کنندگان برسد و افزایش روزانهٔ تقاضا برای این محصول، خسارت به این محصولات بعد از برداشت، مشکلی جدی برای این محصولات محسوب می‌شود [۴، ۱۳]. طی انبارداری این محصولات عوامل بیماری‌زای قارچی به‌طور عمده درصد بالایی از این محصولات انباری را از بین می برند [۱۸]. این عوامل بیماری‌زا خسارت چشمگیری به محصولات غذایی مختلف در کشورهای گرمسیری و معتدل وارد می‌سازند [۶و۳۴]. خسارت به محصولات انباری بر اثر بیماری‌های گیاهی در کشورهای صنعتی و پیشرفته حدود ۲۵ درصد و در کشورهای در حال توسعه تا ۵۰ درصد نیز می‌رسد [۲۷]. میوه ها، به علت اسیدیتهٔ بالا، رطوبت زیاد و نوع ترکیب مواد غذایی و زخم‌های ناشی از برداشت و حمل‌ونقل، مستعد حملهٔ عوامل قارچی هستند. از طرفی پایین بودن pH باعث حساسیت ویژهٔ آن‌ها به پوسیدگی‌های قارچی می‌شود [۳۱].

استفاده از مواد شیمیایی مثل قارچ‌کش‌ها می‌تواند از بافت میوه در برابر عوامل بیماری زا محافظت کند؛ اما استفاده از این مواد روی تعداد محدودی از این گونه‌های گیاهی مجاز است [۳]. از طرفی استفاده از این مواد شیمیایی به علت سرطان‌زایی، دورهٔ تجزیه طولانی، آلودگی محیط زیست و سایر آثار سوء آن‌ها روی مواد غذایی (نظیر سمیت و ایجاد رایحهٔ بد) و سلامتی انسان ها محدود شده است [۳۲].

امروزه مواد استخراج شده از گیاهان دارویی از جمله اسانس‌های گیاهی می‌توانند به‌عنوان روشی جایگزین قارچ‌کش‌های شیمیایی معرفی شوند[۳]. از نظر شیمیایی اسانس ها ترکیبات پیچیده ای هستند که انواع مختلف مواد شیمیایی شامل هیدروکربن‌ها، الکل‌ها، کتون‌ها، آلدئیدها و غیره در ترکیبات آن‌ها وجود دارد که به‌عنوان عوامل ضدمیکروبی استفاده می‌شوند [۳و۱۰]. دارچین[1] درختچه‌ای کوچک، همیشه‌سبز، از تیره برگ‌بو[2] است، که از تمام قسمت های آن بوی مطبوع استشمام می شود [۱۴]. اسانس دارچین قادر است که از رشد میکروارگانیزم‌های اصلی فاسد کنندهٔ غذاهای با رطوبت متوسط پیشگیری کند، استفادهٔ آن در آب شست‌وشوی سبزیجات، موفقیت زیادی در کنترل کپک‌ها و بیمارگرهای سبزیجات داشته است[۱۱].

پوست درخت دارچین غنی از ماده سیناماآلدئید است که به شدت الکترومنفی است. چنین ترکیبات الکترومنفی با فرآیندهای بیولوژیکی دخیل در انتقال الکترون تداخل دارند. بنابراین، می توانند با ترکیبات حاوی نیتروژن مثل پروتئین ها و اسیدهای نوکلئیک واکنش نشان دهند و از این طریق مانع از رشد میکروارگانیسم‌ها می‌شوند [۱۲]. به‌طورکلی در مطالعات مختلف انجام شده روی فرآورده‌های دارچین فعالیت های ضد قارچی [۲۴]، ضد باکتریایی [۴و۴۰] آن به اثبات رسیده است. در اسانس این گیاه ترکیباتی از قبیل ترپنین، سینئول، لینالول، آلفا، ترپینئول، کاریوپیلن، سیناماالدهاید، اوژنول، سینامیل استات و کومارین شناسایی شده است. در بین این ترکیبات سیناماالدهاید، آلدئیدی معطر و خوش‌بو است که فعالیت ضدمیکروبی فراوانی دارد [۳۰].

هدف از پژوهش حاضر، شناسایی ترکیبات موجود در اسانس پوست تنهٔ درختچهٔ دارچین و بررسی فعالیت ضدقارچی این اسانس روی رشد قارچ‌های عامل بیماری محصولات انباری، از جمله *Aspergillus niger* عامل کپک سیاه گوجه‌فرنگی، *Botrytis cinerea* عامل کپک دوده‌ای میوه توت‌فرنگی و *Penecillium digitatum* عامل کپک سبز پرتقال است.

1. *Cinnamomum Zeylanicum* Blume
2. Lauraceae

Archive of SID
www.SID.ir

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. جداسازی و خالص‌سازی قارچ عامل بیماری

برای جداسازی قارچ‌های بیماری‌زا *Aspergillus niger*، *Penecillium digitatum* و *Botrytis cinerea* از میوه‌های مشکوک به علائم این بیماری‌های قارچی در انبارداری های سطح شهرستان خرم‌آباد در سال ۱۳۹۴-۱۳۹۵ شمسی نمونه‌برداری انجام شد. از میوه‌های مشکوک به آلودگی نخست ناحیهٔ مرز بین بافت سالم و آلوده به تکه‌های ۴-۵ میلی‌متری خرد و سپس با استفاده از هیپوکلریت سدیم یک درصد ضدعفونی سطحی شدند و در تشتک‌های پتری حاوی محیط‌های غذایی سیب‌زمینی-دکستروز-آگار[1] کشت داده شدند. پرگنه های رشد کرده که مشخصات قارچ‌های موردنظر را داشتند، از طریق روش تک اسپور کردن خالص‌سازی شدند. در نهایت برای شناسایی جدایه‌های قارچی عامل بیماری در حد گونه از مقالات و کلیدهای شناسایی معتبر استفاده شد [۱۵و۲۲].

۲.۲. تهیهٔ میوه

میوه‌های سالم گوجه‌فرنگی، پرتقال و توت‌فرنگی و در مراحل نزدیک به رسیدن به صورتی که از نظر رنگ، شکل، اندازه و وزن یکسان باشند، از میدان میوه و تره‌بار شهرستان خرم‌آباد و از یک مکان تهیه شدند.

۳.۲. تهیه اسانس

اسانس پوست درخت دارچین به روش تقطیر با بخار آب توسط دستگاه کلونجر طی سه ساعت گرفته شد. به این صورت که نخست ۱۰۰ گرم از پوست دارچین خشک شده را در بالن ریخته و سپس ۹۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به آن اضافه شد. اسانس تهیه شده توسط سدیم سولفات آبگیری و در ظروف شیشه‌ای تیره با روپوش پارافیلم و ورقه آلومینیومی در دمای چهار درجه سانتی‌گراد در یخچال تا زمان آنالیز اسانس و آزمون بیولوژیک نگهداری شدند [۱].

۴.۲. سنجش فعالیت ضد قارچی اسانس دارچین در شرایط آزمایشگاه

بدین‌منظور از روش تدخینی استفاده شد. نخست یک حلقه میسلیومی از حاشیه کشت‌های جدایه‌های قارچی در مرکز هر ظرف پتری حاوی PDA قرار داده شد و سپس در درب ظروف پتری، کاغذ آغشته به غلظت‌های مختلف اسانس قرار گرفت. فضای بین پتری ها به وسیلهٔ پارافیلم مسدود و به حالت وارونه در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد انکوباته شدند. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی تحت تیمارهای غلظت های صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتر در لیتر روی قارچ‌های بیماری زا در چهار تکرار انجام شد. تیمار شاهد در این آزمایش غلظت صفر اسانس دارچین بود. تا کامل شدن رشد قارچ در تیمار شاهد قطر پرگنه‌های قارچی اندازه‌گیری شد. به‌منظور بررسی ویژگی قارچ‌کشی یا قارچ ایستایی اسانس‌ها، حلقه میسلیومی تیمارهایی که رشد قارچی در آن‌ها مشاهده نشد. روی محیط کشت PDA مجدداً کشت شدند و رشد یا عدم رشد قارچ روی محیط کشت پس از یک هفته بررسی شد [۲].

درصد بازدارندگی اسانس‌ها و مواد مؤثرهٔ آن‌ها با استفاده از فرمول ۱ محاسبه شد [۹]:

$$IP = \frac{dc-dt}{dc} \times 100 \qquad :(۱)$$

در این رابطه IP درصد بازداری از رشد، dc میانگین قطر رشد قارچ در تیمار شاهد (سانتی متر)، dt میانگین قطر رشد قارچ در تیمار موردنظر (سانتی‌متر) است.

1. Potato Dextrose Agar (PDA)

Archive of SID
www.SID.ir

۵.۲. تعیین MIC و MFC اسانس

به منظور تعیین حداقل غلظت ممانعت از رشد[1] و حداقل غلظت قارچ کشی[2] پلیتی که کاهش ۹۰ درصدی رشد را در مقایسه با شاهد مثبت نشان داد، به عنوان غلظت MIC و پلیتی که در آن غلظت از اسانس و در مقایسه با پلیت شاهد مثبت هیچ رشد قابل ملاحظهٔ قارچی حتی بعد از انکوباسیون کشت های مجدد، مشاهده نشد به‌عنوان MFC در نظر گرفته شد.

۶.۲. بررسی تأثیر اسانس بر بافت گیاهی

آزمایش اثر اسانس بر بافت میوه‌های سالم و تقریباً یکدست با سوسپانسیون اسپور با غلظت 10^6 اسپور در میلی‌متر (تعیین غلظت اسپور با استفاده از لام هماتوسیتومتر یا گلبول شمار[3]) انجام گرفت. نخست میوه‌ها زیر جریان ملایم به مدت ۱۰ دقیقه شستشو داده شد و پس از خشک‌شدن برای تزریق سوسپانسیون اسپوری در تعداد کافی به زیر هود (لامینارفلو) منتقل شدند. سپس روی میوه‌ها زخم‌های سطحی به عمق ۰/۵ میلی‌متر و طول یک تا دو سانتی‌متر (طول زخم روی میوه‌های گوجه‌فرنگی و پرتقال دو سانتی‌متر و توت‌فرنگی یک سانتی متر بود) ایجاد شد. سپس سوسپانسیون اسپوری که از قبل تهیه شده بود به مقدار ۱۰ میکرولیتر با سمپلر به زخم‌های ایجاد شده روی میوه‌ها تزریق شد. از هر میوه سه عدد درون ظروف پلی‌اتیلن که ۲۴ ساعت قبل از آزمایش با الکل ضدعفونی شده بودند، با حجم سه لیتر گذاشته شد که برای هر غلظت سه تکرار در نظر گرفته شد. از اسانس دارچین در غلظت‌های صفر (شاهد) و غلظت MIC سوسپانسیونی در آب مقطر استریل تهیه شد که از توئین ۸۰[4] درصد به‌عنوان سورفاکتانت اسانس در آب مقطر استفاده شد. سپس روی میوه‌ها اسپری‌پاشی شد. به‌منظور تأمین رطوبت مورد نیاز، ۲۰ سی‌سی آب مقطر درون ظرفی ریخته و داخل ظرف میوه گذاشته شد. سپس درب جا میوه ای کاملاً بسته و در محیط آزمایشگاه با دمای ۲۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از آنکه در میوه‌های شاهد علائم به‌صورت کامل (۱۰۰ درصد) ظاهر شد. یادداشت برداری از نمونه ها انجام شد. به این صورت که هر میوه به ۸ قسمت مساوی تقسیم و هر قسمت معادل ۱۲/۵ درصد در نظر گرفته شد. در نهایت قطعات سالم و آلودهٔ میوه‌ها شمارش و یادداشت شد [۲].

۷.۲. آنالیز اسانس‌ها

جداسازی، اندازه‌گیری و شناسایی ترکیبات اسانس توسط دستگاه GC شرکت شیمودزو[5] مدل GC-17A مجهز به آشکارساز طیف‌سنج جرمی مدل MS-QP5050 در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه لرستان انجام گرفت. جداسازی ترکیبات در ستون موئین سیلیکای گداخته از نوع (۵٪ Phenyl 95% Methylpolysiloxan (BP-X5 با ابعاد قطر داخلی ۰/۲۲ میلی متر، ضخامت فیلم نازک ۰/۲۵ میکرومتر و طول ۳۰ متر صورت گرفت.

۸.۲. آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل داده‌های آماری در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS 9.1 انجام و برای انجام مقایسهٔ میانگین‌ها از روش دانکن و از نرم‌افزار Microsoft office excel 2013 برای رسم نمودارها استفاده شد.

1. Minimum Inhibitory Concentration (MIC)
2. Minimum Fungicidal Concentration (MFC)
3. Hemocytometer
4. Tween 80
5. Shimudzu

Archive of SID
www.SID.ir

۳. نتایج و بحث

مشخصات، مقدار و اجزاء تشکیل دهندهٔ اسانس پوست درخت دارچین با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی [1] براساس زمان بازداری[2] و درصد شباهت[3] شناسایی و اندازه‌گیری شد. در این روش سطح زیر نمودار بیانگر درصد آن اسانس است که سینامآلدهید[4] بیشترین درصد اسانس را تشکیل داد و نزدیک به ۹۰ درصد از ترکیب این اسانس را شامل شد (شکل ۱).

آنالیز اسانس منجر به شناسایی ۱۴ ترکیب در اسانس دارچین شده که ۹۶/۲۴ درصد از اسانس را شامل شد. نتایج آنالیز ترکیبات موجود در اسانس دارچین نشان داد که ۸۹/۵۱ درصد از این اسانس را ترکیب سینامآلدهید تشکیل می‌دهد. بعد از این ترکیب سینامیل استات[5] با ۴/۵۶ درصد، Cinnamaldehyde (p-methoxy) با ۰/۹۷ درصد و کوببن[6] با ۰/۲۹ درصد بیشترین ترکیبات تشکیل دهنده در این اسانس است. سایر ترکیبات مشاهده شده در جدول ۱ روی هم کمتر از یک درصد از ترکیبات این اسانس را شامل می‌شوند (جدول ۱).

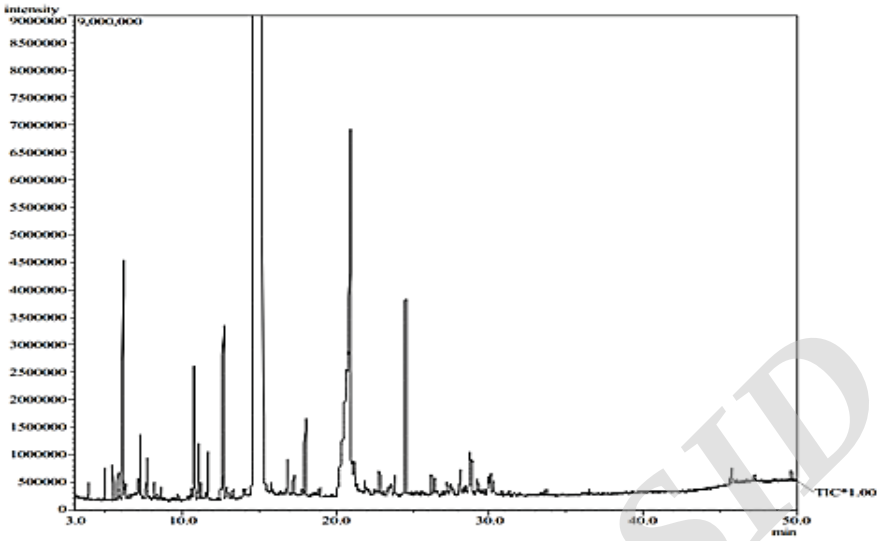
در سایر پژوهش‌های مشابه نیز سینامآلدهید بیشترین ترکیب تشکیل دهنده دارچین است [۷، ۱۶، ۲۳ و ۳۸]. در پژوهش دیگری ترنس-سینامآلدهید[7]، متوکسی فنول[8] و پروپانول[9] به عنوان دیگر ترکیبات شناسایی شده در دارچین معرفی شده است [۱۹]. همچنین مشخص شده که قسمت عمدهٔ اسانس دارچین حاوی ترکیباتی چون سینامآلدهید، ترنس سینامآلدهید، بنزآلدهید[10] و ترنس سینامیک اسید[11] است [۳۹]. که نتایج آن با پژوهش حاضر مطابقت دارد. در مطالعهٔ دیگری نیز بیان شده است که عمدهٔ ترکیبات اسانس دارچین (بیش از ۹۷ درصد) شامل E-سینامآلدهید[12]، لینالول[13]، یوژینول[14]، سینئول[15]، E-سینامیل استات[16]، کاریوفیلن[17] و پینن[18] است [۵].

تجزیه واریانس تأثیر اسانس دارچین در بازدارندگی از رشد قارچ‌های *A. niger*، *P. digitatum* و *B.cinerea* روی محیط کشت PDA تفاوت معناداری در سطح یک درصد برای هر سه قارچ نشان داد (جدول ۲).

همهٔ غلظت‌های مورد استفاده در بازدارندگی رشد قارچ‌ها با تیمار کنترل (غلظت صفر) تفاوت معنا داری در سطح یک درصد نشان دادند. در کمترین غلظت به‌کار برده شده (۵۰ µl/l) علیه قارچ‌های A. niger، P. digitatum و B.cinerea به‌ترتیب ۲۸/۴۴، ۳۰ و ۲۷/۵۰ درصد از رشد این قارچ‌ها جلوگیری شد و در غلظت‌های ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میکرو لیتر در لیتر به طور کامل از رشد هر سه قارچ جلوگیری شد. غلظت‌های بالاتر از ۲۰۰ میکرو لیتر در لیتر بیش از ۹۰ درصد از رشد این قارچ‌ها جلوگیری کرد؛ به نحوی‌که قارچ‌های A. niger، P. digitatum و B.cinerea در غلظت ۲۰۰ میکرو لیتر در لیتر به ترتیب ۶/۲۵، ۷/۵۰ و ۶/۸۷ درصد رشد کردند (جدول ۳ و شکل ۲).

1. GC-MAS
2. Retention Time
3. Similarity
4. Cinnamaldehyde
5. Cinnamyl Acetate
6. Cubebene
7. Trans-Cinnamaldehyde
8. Methoxyphenyl
9. Propenal
10. Benzaldehyde
11. Trans- Cinnamic Acid
12. E-Cinnamaldehyde
13. Linalool
14. Eugenol
15. Cineole
16. E-Cynnamyl Acetate
17. Caryophyllene
18. Pinene

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۱. کروماتوگرافی اسانس دارچین با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی GC-Mass

جدول ۱. نوع و درصد مواد شناسایی‌شده در اسانس دارچین

نام ترکیبات	RI (STD)	RI (Calc)	t'R (A)	درصد تشابه	مقدار (درصد)
Hexanal	۸۰۰	۸۰۴/۷۶	۳/۷۵	۹۵	۰/۰۳
Pinene (aipha)	۹۳۹	۹۴۳/۳۳	۵/۴۵	۹۶	۰/۰۶
Camphene	۹۵۳	۹۶۳/۳۳	۵/۷۵	۹۶	۰/۰۶
Limonene	۱۰۳۱	۱۰۳۹/۲۸	۷/۱۲	۹۳	۰/۰۴
Tolualdehyde	۱۰۶۶	۱۰۶۳/۳۲	۷/۶۲	۹۶	۰/۱۱
Linalool	۱۰۹۸	۱۱۰۶/۹۸	۸/۵۸	۸۹	۰/۰۳
Cinnamaldehyde	۱۳۱۸	۱۳۱۶/۰۰	۱۵/۱۹	۹۶	۸۹/۵۱
Terpinyl acetate(alpha)	۱۳۵۰	۱۳۵۹/۲۹	۱۷/۸۲	۹۵	۰/۱۳
Eugenol	۱۳۶۵	۱۳۶۹/۸۴	۱۷/۲۲	۹۱	۰/۰۸
Cubebene	۱۳۹۰	۱۳۹۰/۰۳	۱۷/۹۸	۹۲	۰/۲۹
Cinnamyl acetate	۱۴۴۳	۱۴۶۵/۸۹	۲۰/۹۱	۸۱	۴/۵۶
Valencene	۱۴۹۱	۱۴۸۹/۸۵	۲۱/۹۰	۸۵	۰/۰۴
Cadina-1:4 diene	۱۵۳۲	۱۵۳۲/۳۲	۲۳/۵۷	۸۶	۰/۱۳
Calamenene	۱۵۳۲	۱۵۳۹/۱۹	۲۳/۸۴	۹۴	۰/۰۸
Cinnamaldehyde (p-methoxy)	۱۵۶۱	۱۵۵۶/۲۳	۲۴/۵۱	۸۱	۰/۹۷
Cadinol	۱۶۴۰	۱۶۴۸/۰۶	۲۸/۰۹	۸۶	۰/۱۲

Archive of SID
www.SID.ir

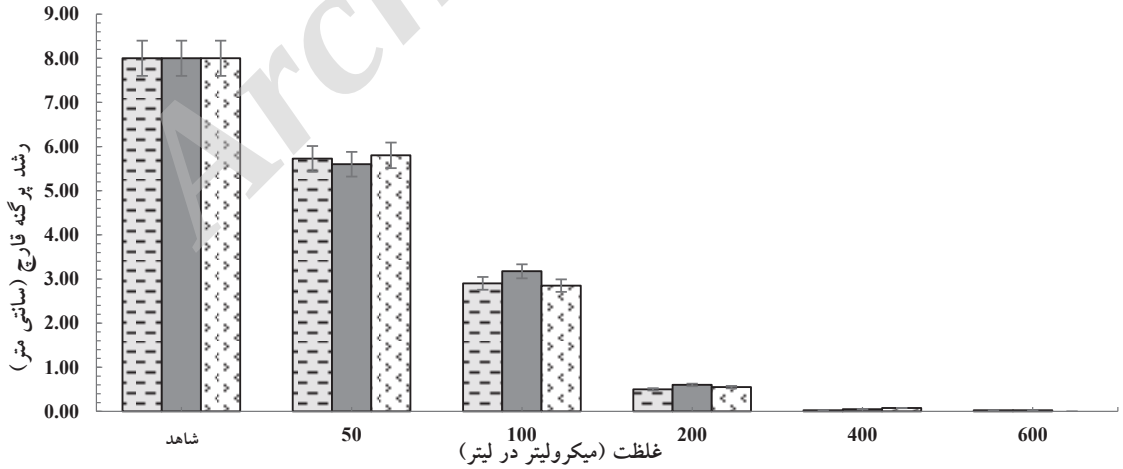
جدول ۲. تجزیهٔ واریانس تأثیر اسانس دارچین در بازدارندگی از رشد قارچ‌های *A. niger*، *P. digitatum* و *B.cinerea* روی محیط PDA

منابع تغییرات	درجهٔ آزادی		ضریب تغییرات (٪)	مجموع مربعات (SS)	میانگین مربعات (MS)	مقادیر F	P-value
	تیمار	خطا					
A. niger	۷	۲۱	۱۱/۷۴	۳۲۹/۱۳	۴۶/۴۵	۱۴۴/۵۹**	۰/۰۰۰۱
P. digitatum	۷	۲۱	۱۰/۶۸	۳۴۲/۷۶	۴۶/۳۹	۱۶۱/۵۴**	۰/۰۰۰۱
B.cinerea	۷	۲۱	۹/۴۴	۳۴۰/۴۲	۴۸/۶۴	۱۶۹/۳۸**	۰/۰۰۰۱

**سطح معناداری p< ۰/۰۱، *سطح معناداری ۰/۰۵ > p > ۰/۰۱، معنادار نشدن p >۰/۰۵

جدول ۳. تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس دارچین روی رشد قارچ‌های انباری در روی محیط PDA

غلظت اسانس (میکرو لیتر در لیتر)	*A. niger*		*P. digitatum*		*B.cinerea*	
	قطر پرگنه (cm)	درصد بازدارندگی	قطر پرگنه (cm)	درصد بازدارندگی	قطر پرگنه (cm)	درصد بازدارندگی
صفر (شاهد)	۸/۰۰	۰/۰۰^{e}	۸/۰۰	۰/۰۰^{e}	۸/۰۰	۰/۰۰^{e}
۵۰	۵/۷۳	۲۸/۴۴^{d}	۵/۶۰	۳۰/۰۰^{d}	۵/۸۰	۲۷/۵۰^{d}
۱۰۰	۲/۹۰	۶۳/۷۵^{c}	۳/۱۸	۶۰/۳۱^{c}	۲/۸۵	۶۴/۳۸^{c}
۲۰۰	۰/۵۰	۹۳/۷۵^{ab}	۰/۶۰	۹۲/۵۰^{b}	۰/۵۵	۹۳/۱۳^{ab}
۴۰۰	۰/۰۳	۹۹/۶۹^{a}	۰/۰۵	۹۹/۳۸^{a}	۰/۰۸	۹۹/۰۶^{a}
۶۰۰	۰/۰۳	۹۹/۶۹^{a}	۰/۰۳	۹۹/۶۹^{a}	۰/۰۰	۱۰۰^{a}
۸۰۰	۰/۰۰	۱۰۰^{a}	۰/۰۰	۱۰۰^{a}	۰/۰۰	۱۰۰^{a}
۱۰۰۰			۰/۰۰	۱۰۰^{a}	۰/۰۰	۱۰۰^{a}



شکل ۲. تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس دارچین بر بازدارندگی از رشد قارچ‌های *B. cinerea*، *A. niger* و *P. digitatum* روی محیط کشت PDA

Archive of SID
www.SID.ir

در پژوهش‌های مشابه فعالیت ضدقارچی اسانس گیاه دارچین علیه قارچ‌های *Rhizopus nigricans*، *Aspergillus flavus* و *Penicillium expansum* در محیط کشت بررسی و مشخص شد که این اسانس خاصیت ضدقارچی بالایی علیه این بیماری‌های گیاهی پس از برداشت دارد [۳۹]. همچنین، این اسانس فعالیت ضد قارچی قوی روی *Aspergillus flavus*، *Aspergillus niger* و *Aspergillus fumigatus* دارد [۸، ۲۰]. در پژوهشی مشابه اسانس دارچین در غلظت ۴ درصد باعث مهار رشد و جوانه زنی اسپور *Colletotrichum musae* تا حدود ۸۳ درصد شد [۲۱]. در پژوهش دیگری اسانس دارچین در غلظت ppm ۲۵ تولید اسپور قارچ *Colletotrichum coccodes*، *Botrytis cinerea*، *Cladosporium herbarum*، *Rhizopus stolonifer* و *Aspergillus niger* تا ۶۳ درصد کاهش داد و در غلظت ppm ۵۰۰ تولید اسپور این قارچ‌ها به‌طور کامل متوقف شد [۳۳].

حداقل غلظت ممانعت از رشد برای هر سه قارچ در غلظت ۲۰۰ میکرو لیتر در لیتر و حداقل غلظت قارچ کشی در غلظت ۴۰۰ میکرو لیتر در لیتر است. در حداقل غلظت ممانعت از رشد، از رشد قارچ‌های *A. niger*، *P. digitatum* و *B.cinerea* به ترتیب ۹۳/۷۵، ۹۲/۵۰ و ۹۳/۱۳ درصد جلوگیری به عمل آمد. از غلظت های بالاتر از ۲۰۰ میکرولیتر در لیتر برای تعیین حداقل غلظت قارچ‌کشی، کشت مجدد به عمل آمد که مشخص شد این قارچ‌ها در غلظت ۴۰۰ میکرولیتر در لیتر بعد از کشت مجدد دیگر رشدی نخواهند داشت از این رو این غلظت به‌عنوان غلظت MFC انتخاب شد (جدول ۴).

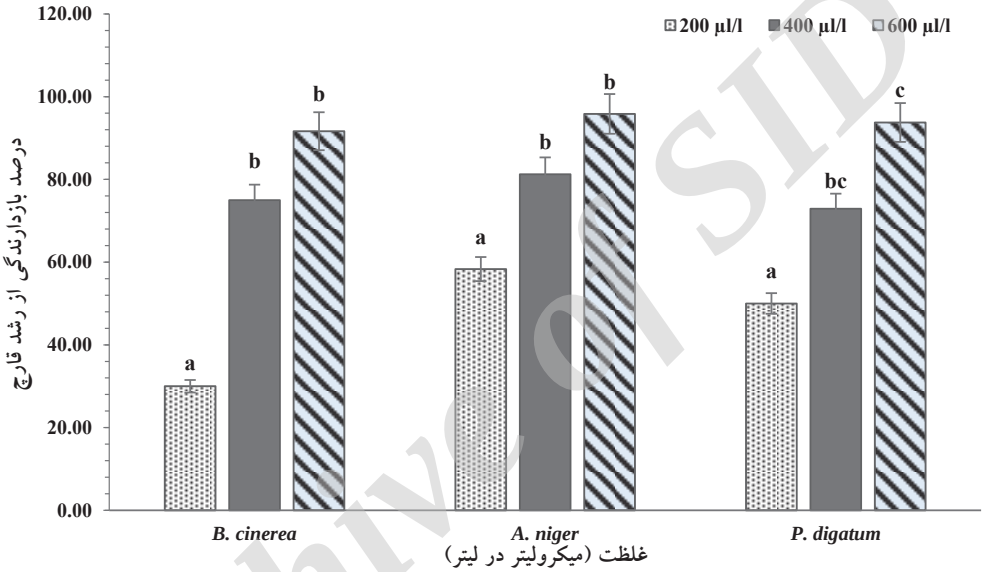
در پژوهش‌های مشابه دیگری نیز *MIC* و *MFC* اسانس دارچین بررسی شده است. برای مثال حداقل غلظت بازدارندگی از قارچ‌های *Aspergillus niger*، *Alternaria alternata*، *Colletotrichum gloeosporioides*، *Lasiodiplodia theobromae*، *Phomopsis viticola* و *Rhizopus stolonifer* توسط اسانس دارچین به‌ترتیب در غلظت ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تعیین شده است [۲۹]. حداقل غلظت بازدارندگی از رشد این اسانس روی قارچ‌های *Candida albicans*، *Candida tropicalis* و *Candida krusei* به ترتیب ۰/۰۶۴، ۰/۱۲۹ و ۰/۱۲۹ گرم در میلی‌لیتر تعیین شده است [۳۵]. در پژوهش مشابه دیگری وانگ و همکاران بیان داشتند اسانس دارچین آثار مهاری قوی روی رشد قارچ های پوسیدگی سفید و چهار گونه از قارچ پوسیدگی های قهوه‌ای درختان نشان داد و در غلظت *ppm* ۱۰۰ به طور کامل از رشد این قارچ‌ها جلوگیری به عمل آورد حداقل غلظت قارچ کشی این اسانس روی قارچ‌های *Coriolus versicolor* و *Laetiporus sulphureus* به‌ترتیب ۵۰ و *ppm* ۷۵ بود [۳۶].

تأثیر اسانس دارچین در جلوگیری از پوسیدگی میوه‌های گوجه‌فرنگی، پرتقال و توت‌فرنگی آلوده به قارچ‌های *A. niger*، *P. digitatum* و *B.cinerea* نشان داد که میوهٔ توت‌فرنگی در مجاورت این اسانس در غلظت‌های ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میکرولیتر در لیتر به ترتیب ۴۵، ۳۰ و ۱۱/۵۳ درصد، گوجه‌فرنگی در همین غلظت‌ها به‌ترتیب ۵۰/۰۹، ۲۵/۱۵ و ۷/۳۰ و میوهٔ پرتقال به‌ترتیب ۴۵، ۲۰/۳۰ و ۱۰/۱۰ درصد آلودگی نشان دادند. این میزان آلودگی در تمامی غلظت‌ها نسبت به شاهد سالم تفاوت معناداری در سطح یک درصد آماری نشان دادند. غلظت‌های ۴۰۰ و ۶۰۰ میکرو لیتر در لیتر اسانس در کاهش آلودگی بافت میوه در مواجهه با قارچ‌های آلوده‌کننده در سطح یک درصد آماری تفاوت معنا داری با یکدیگر نشان ندادند. این در حالی بود که در غلظت ۲۰۰ میکرولیتر در لیتر با غلظت ۴۰۰ و ۶۰۰ میکرولیتر در سطح یک درصد آماری تفاوت معناداری وجود داشت (شکل ۳).

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۴. حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی اسانس دارچین در بازدارندگی از رشد قارچ‌های انباری

قارچ	غلظت	
	MIC	MFC
A. niger	۲۰۰	۴۰۰
P. digatum	۲۰۰	۴۰۰
B.cinerea	۲۰۰	۴۰۰



شکل ۳. تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس دارچین (میکرولیتر در لیتر) بر کاهش خسارت قارچ‌های B. cinerea، A. niger و P. digitatum به‌ترتیب روی میوه‌های توت فرنگی، گوجه فرنگی و پرتقال

تأثیر اسانس دارچین در کاهش پوسیدگی های میوه های انباری در سایر پژوهش های مشابه نیز بررسی شده است؛ اسانس گیاه دارچین باعث کاهش فعالیت قارچ های *Rhizopus nigricans*، *Aspergillus flavus* و *Penicillium expansum* روی میوه‌های عناب و پرتقال شده است [۳۸]. اسانس گیاه دارچین در غلظت ۳ درصد باعث محافظت از موز در برابر قارچ *Colletotrichum musae* به مدت ۲۸ روز شد بدون اینکه در خواص فیزیکی و شیمیایی موز تأثیر منفی بگذارد و در غلظت های بالاتر اثر سمی روی میوه دارد [۲۱]. همچنین این اسانس از پوسیدگی های قارچی بعد از برداشت انگور تا حدود زیادی جلوگیری به عمل آورده است [۲۹]. مشخص شده که اسانس دارچین تا حدود زیادی از میوهٔ موز در برابر قارچ های مولد پوسیدگی شامل *Colletotrichum musae*، *Lasiodiplodia theobromae* و *Fusarium* spp. محافظت می‌کند. [۳۷].

فعالیت ضد قارچی دارچین به خاطر وجود ماده سینامآلدهید است؛ که یک آلدهید معطر و خوش بو است که مانع از فعالیت اسید آمینهٔ دی کربوکسیلاز می شود و

Archive of SID
www.SID.ir

به شدت الکترومنفی است. چنین ترکیباتی با فرآیندهای بیولوژیکی دخیل در انتقال الکترون تداخل دارند و با ترکیبات حاوی نیتروژن مثل پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک واکنش نشان می دهند که از این طریق مانع از رشد میکروارگانیسم‌ها می‌شوند [۱۲]. دارچین به دلیل داشتن ترکیبات فنولیک و سایر ترکیبات آنتی‌اکسیدانی دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و قارچ‌کشی نیز است. از مهم‌ترین ترکیبات آنتی‌اکسیدانی دارچین می توان به سیناماآلدهید، کومارین[1]، یوژینول، سیناکاسیول[2]، سینامیک اسید و گاما ترپینن[3] است [۲۴و۲۸]. همچنین، مشخص شده است نیمه چربی گرایی ترکیبات موجود در اسانس دارچین مسئول ایجاد خاصیت ضدمیکروبی این گیاه است [۱۲]. در پژوهش‌های دیگری ترکیب غالب اسانس دارچین مادهٔ سیناماآلدهید است که خاصیت ضد قارچی و ضد میکروبی آن ثابت شده است [۳۰]. در پژوهش مشابه دیگری نیز بیان شده است که آثار ضدقارچی دارچین به علت سیناماآلدهید موجود در این اسانس است [۳۶].

با توجه به اینکه درصد عمده ای از اسانس پوست دارچین حاوی سیناماآلدهید است و با توجه به پژوهش‌های مشابه دیگر می توان بیان کرد وجود سیناماآلدهید در اسانس گیاه دارچین باعث خاصیت ضدقارچی این گیاه علیه قارچ‌های *A. niger* عامل کپک سیاه گوجه‌فرنگی، *B. cinerea* عامل کپک دوده‌ای میوه توت‌فرنگی و *P. digitatum* عامل کپک سبز پرتقال شده است. به نحوی که در غلظت ۲۰۰ میکرولیتر در لیتر بیش از ۹۰ درصد از رشد این قارچ‌ها جلوگیری به عمل آورده است. استفاده از اسانس گیاه دارچین می تواند تا حدود زیادی از رشد عوامل بیماری زای گیاهی بعد از برداشت جلوگیری به عمل آورد و می توانند جایگزین مناسبی در استفاده از مواد شیمیایی باشند. ولی فرّار بودن این ترکیبات باعث شده که ماندگاری آن‌ها در محیط کم شود و به‌کارگیری روش هایی برای ماندگاری بیشتر این ترکیبات در محیط می تواند نویدبخش روش کنترلی مؤثر در بیماری های گیاهی باشد. همچنین با توجه به اینکه در این پژوهش اسانس دارچین تأثیر بسزایی در کنترل این پاتوژن‌های انباری مهم دارد، توصیه می‌شود در پژوهش‌های آینده خواص ارگانولپتیکی این محصولات تحت تأثیر این اسانس و پاتوژن‌ها گیاهی و همچنین ماندگاری اسانس گیاه دارچین روی محصولات مورد نظر بررسی شود.

1. Coumarin
2. Cinnacassiol
3. Gamma-Terpinene

منابع

۱. جایمند ک. و رضایی م. (۱۳۹۰) دستگاه‌های تقطیر، روش‌های آزمون و شاخص‌های بازداری در تجزیهٔ اسانس. چاپ اول، انجمن گیاهان دارویی، تهران. ۳۵۰ ص.

۲. درویش نیا م.، رضایی‌نژاد ع.ا. و دلفان ب. (۱۳۹۴) اثر اسانس مرزهٔ خوزستانی، رشینگری، کارواکرول و قارچکش بنومیل بر بازدارندگی رشد قارچ Botrytis cinerea عامل بیماری پوسیدگی خاکستری میوه. به‌زراعی کشاورزی. ۱۷ (۲): ۵۳۱-۵۴۰.

3. Abasi M. (2010) Sustainable use of natural ingredients in controlling complications after harvesting agricultural crops. Journal Olives, 211 p.

4. Abbasi A.M., Khan M.A., Ahmad M., Zafar M., Khan H., Muhammad N. and Sultana S. (2009) Medicinal plants used for the treatment of jaundice and hepatitis based on socio-economic documentation. African Journal of Biotechnology. 8(8): 24-35.

Archive of SID
www.SID.ir

5. Abdollahzadeh E., Ojagh S.M., Hosseini H., Irajian G. and Ghaemi E.A. (2016) Predictive modeling of survival/death of Listeria monocytogenes in liquid media: Bacterial responses to cinnamon essential oil, ZnO nanoparticles, and strain. Food Control. 8: 1-12.

6. Alkahtani M., Abdel-Kareem MHE, El-Naggar M.A. and Sarhan E.A.D. (2011) Some of soil Streptomyces isolates decrease toxigenic capability of Fusarium verticillioides in vitro. American Journal of Biochemistry and Molecular Biology. 1: 389–398.

7. Arancibia M., Giménez B., López-Caballero M.E., Gómez-Guillén M.C. and Montero P. (2014) Release of cinnamon essential oil from polysaccharide bilayer films and its use for microbial growth inhibition in chilled shrimps. LWT-Food Science and Technology. 59 (2): 989-95.

8. Bansod S. and Rai M. (2008) Antifungal activity of essential oils from Indian medicinal plants against human pathogenic Aspergillus fumigatus and A. niger. World Journal of Medical Sciences. 3(2): 81-8.

9. Deans S.G. and Svoboda K.P. (1990) The antimicrobial properties of marjoram (Origanum majarana L.) volatile oil. Flavour and Fragrance Journal. 5: 187-190.

10. Ferrante A., Alberici A., Antonacci S. and Serra G. (2007) Effect of promoter and inhibitors of phenylalanine ammonia-lyase enzyme on stem bending of cut gerbera flowers. International Conference on Quality Management in Supply Chains of Ornamentals. 75: 471-476.

11. Goni P., Lopez P., Sanchez C., Gómez-Lus R., Becerril R. and Nerín C. (2009) Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. Food Chemistry. 116(4): 982-9.

12. Gupta C., Garg A.P., Uniyal R.C. and Kumari A. (2008) Comparative analysis of the antimicrobial activity of cinnamon oil and cinnamon extract on some food-borne microbes. African Journal of Microbiology Research. 2(9): 247-51.

13. Hanekom E., Sivakumar D., Naudé Y., Rohwer E.R. and Korsten L. (2010) Retracted: Influence of postharvest treatments on visual appearance, sensory analysis and aroma volatile compounds of 'Mauritius' litchi fruit during storage. Postharvest Biology and Technology. 57(3): 155-61.

14. Hassanzadeh A. (2012) Cinnamon and its properties. Monthly Training and New Technology Research of Food. 22: 37-39.

15. Houbraken J., Visagie C.M., Meijer M., Frisvad J.C., Busby P.E., Pitt J.I., Seifert K.A., Louis-Seize G., Demirel R., Yilmaz N. and Jacobs K. (2014) A taxonomic and phylogenetic revision of Penicillium section Aspergilloides. Studies in mycology. 78: 373-451.

16. Isman M.B. (2016) Pesticides based on plant essential oils: phytochemical and practical considerations. Medicinal and aromatic crops, Production, Phytochemistry and Utilization American Chemical Society. pp. 13-26.

17. Kavanagh K. (2006) Medical Mycology Cellular and Molecular Techniques. 4th Ed. Recherche, Kildare, Irland, 305 p.

18. Korsten L. (2006) Advances in control of postharvest diseases in tropical fresh produce. International Journal of Postharvest Technology and Innovation. (1): 48-61.

19. Li Y.Q., Kong D.X. and Wu H. (2013) Analysis and evaluation of essential oil components of cinnamon barks using GC–MS and FTIR spectroscopy. Industrial Crops and Products. 41: 269-78.

Archive of SID
www.SID.ir

20. Manso S., Cacho-Nerin F., Becerril R. and Nerín C. (2013) Combined analytical and microbiological tools to study the effect on Aspergillus flavus of cinnamon essential oil contained in food packaging. Food Control. 30(2): 370-378.

21. Maqbool M., Ali A. and Alderson P.G. (2010) Effect of cinnamon oil on incidence of anthracnose disease and postharvest quality of bananas during storage. International Journal Agriculture and Biology. 12: 516-20.

22. Mirzaei S., Goltapeh E.M. and Shams-Bakhsh M. (2007) Taxonomical studies on the genus Botrytis in Iran. Journal Agriculture Techology. 3 (1): 65-76.

23. Ojagh S.M., Rezaei M., Razavi S.H. and Hosseini S.M. (2010) Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. Food Chemistry. 122(1): 161-6.

24. Parthasarathy V.A., Chempakam B. and Zachariah T.J. (2008) Chemistry of Spices. 7th Ed. CABI North American office, Cambridge, 455p.

25. Ranasinghe L., Jayawardena B. and Abeywickrama K. (2002) Fungicidal activity of essential oils of Cinnamomum zeylanicum (L.) and Syzygium aromaticum (L.) Merr et LM Perry against crown rot and anthracnose pathogens isolated from banana. Letters in Applied Microbiology. 35(3): 208-11.

26. Shan B., Cai Y.Z., Brooks J.D. and Corke H. (2007) Antibacterial properties and major bioactive components of cinnamon stick (Cinnamomum burmannii): activity against foodborne pathogenic bacteria. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 55(14): 5484-90.

27. Spadaro D., Ciavorella A., Dianpeng Z., Garibaldi M. and Gullino M.L. (2010) Effect of culture media and pH on the biomass production and biocontrol efficacy of a Metschnikowia pulcherrima strain to be used as a biofungicide for postharvest disease control. Canadian journal of microbiology. 56(2): 128-37.

28. Suhaj M. (2006) Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. Journal Food Compos Anal. 19: 531-7.

29. Sukatta U., Haruthaithanasan V., Chantarapanont W., Dilokkunanant U. and Suppakul P. (2008) Antifungal activity of clove and cinnamon oil and their synergistic against postharvest decay fungi of grape in vitro. Kasetsart Journal. 42:169-74.

30. Tajkarimi M.M., Ibrahim S.A. and Cliver D.O. (2010) Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food control. 21(9): 1199-218.

31. Tournas V.H. and Katsoudas E. (2005) Mould and yeast flora in fresh berries, grapes and citrus fruits. Interernational Journal food Microbial. 105(1): 11-17.

32. Tripathi P., Dubey N.K. and Shukla A.K. (2008) Use of some essential oils as post-harvest botanical fungicides in the management of grey mould of grapes caused by Botrytis cinerea. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 24(1): 39-46.

33. Tzortzakis N.G. (2009) Impact of cinnamon oil-enrichment on microbial spoilage of fresh produce. Innovative Food Science and Emerging Technologies. 10(1): 97-102.

34. Varma J.N. and Dubey K. (2010) Efficacy of essential oils of Caesulia axillaris and Mentha arvensis against some storage pests causing biodeterioration of food commodities. International Journal Food Microbiology. 68(3): 207-210.

Archive of SID
www.SID.ir

35. Wang G.S., Deng J.H., Min S.H.I. and Bo L.I. (2012) Mechanisms, clinically curative effects, and antifungal activities of cinnamon oil and pogostemon oil complex against three species of Candida. Journal of Traditional Chinese Medicine. 32(1): 19-24.

36. Wang S.Y., Chen P.F. and Chang S.T. (2005) Antifungal activities of essential oils and their constituents from indigenous cinnamon (Cinnamomum osmophloeum) leaves against wood decay fungi. Biores technology. 96(7): 813-818.

37. Win N.K., Jitareerat P., Kanlayanarat S. and Sangchote S. (2007) Effects of cinnamon extract, chitosan coating, hot water treatment and their combinations on crown rot disease and quality of banana fruit. Postharvest biology and technology. 45(3): 333-40.

38. Xing Y., Li X., Xu Q., Yun J. and Lu Y. (2010) Antifungal activities of cinnamon oil against Rhizopus nigricans, Aspergillus flavus and Penicillium expansum in vitro and in vivo fruit test. International journal of food science and technology. 45(9): 1837-42.

39. Zhang Y., Liu X., Wang Y., Jiang P. and Quek S. (2016) Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against Escherichia coli and Staphylococcus aureus. Food Control. 59: 282-9.

40. Zu Y., Yu H., Liang L., Fu Y., Efferth T., Liu X. and Wu N. (2010) Activities of ten essential oils towards Propionibacterium acnes and PC-3, A-549 and MCF-7 cancer cells. Molecules. 15(5): 3200-10.

Archive of SID

www.SID.ir

Crops Improvement
(Journal of Agricultural Crops Production)
Vol. 19 ■ No. 4 ■ Winter 2017

Cinnamon bark essential oil compounds and its antifungal effects against fungal rotting of fruits

Seyed Moslem Moosavian[1], Eaidi Bazgir[2], Aref Moradpuor[3]*

1. Ph. D. Student, Department of Plant Protection, Agricultural Faculty, Lorestan University, Lorestan, Iran
2. Assistant Professor, Department of Plant Protection, Agricultural Faculty, Lorestan University, Lorestan, Iran
3. B.Sc. Student, Department of Plant Protection, Agricultural Faculty, Lorestan University, Lorestan, Iran

Received: December 3, 2016 **Accepted: February 1, 2017**

Abstract

Cinnamon essential oil has been used for centuries to protect food from microbiological infection and in the last ten years. Cinnamon essential oil is also incorporated into food packaging materials as antimicrobial agent. The Main objective of the present study was to determine the antifungal activity of cinnamon essential oil against *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger* and *Penicillium digitatum* fungi isolated from grapes, tomato, and orange. Cinnamon Essential oil was extracted by the Clevenger-type apparatus and identification and amount of the essential oil was performed by using chromatography–mass spectroscopy and gas chromatography. Analysis of the total essential oil content showed that cinnamaldehyde (89.51%), cinnamyl acetate (4.56%), cinnamaldehyde (p-methoxy) (0.97%) and cubebene (0.29%) were the major constituents. The minimum inhibitory concentrations of cinnamon oil against *B.cinerea*, *A. niger* and *P. digitatum* were 200 µl/l and minimum fungicidal concentrations were 400 µl/l for three pathogens. The antifungal activity of cinnamon oil against *A. niger* and *B.cinerea* was stronger than that against *P. digitatum* in MIC concentration and the activity was improved with increasing its concentration. *In vivo* study, the fungi in the vicinity of concentration 600 µl/l of cinnamon essential oil grown in fruits, 11.53% for strawbery, 7.30% for tomato and 10.10% for orange. These results revealed that cinnamon essential oil has a good potential to be as a natural antifungal agent for control postharvest fruit and vegetables disease.

Keywords: anti-fungal, cinnamaldehyde, cinnamon, essential oil, mold.

Corresponding Author: Moslem.moosavian@gmail.ir

Archive of SID

www.SID.ir