

## ترکیب‌های شیمیایی و فعالیت ضدقارچی اسانس میخک‌هندی (*Syzygium aromaticum* L.)

سید مسلم موسویان<sup>۱</sup> و مصطفی درویش‌نیا<sup>۲\*</sup>

۱- دانشجوی دکترای بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

۲- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران، پست الکترونیک: mardarvishnia44@yahoo.com

تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۶

تاریخ اصلاح نهایی: دی ۱۳۹۵

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۵

### چکیده

هدف از این پژوهش، مطالعه فعالیت ضدقارچی گل میخک‌هندی (*Syzygium aromaticum* L.)، علیه سه پاتوژن *Alternaria*، *Botrytis cinerea* و *Fusarium solani* جدا شده از میوه‌های گوجه‌فرنگی، گیلان و سیب‌زمینی با اضافه کردن قارچ به محیط کشت آنها و همچنین شناسایی خاصیت ضد قارچی این اسانس به‌عنوان نگهدارنده مواد غذایی در برابر این پاتوژن‌ها می‌باشد. اسانس گیاه با استفاده از دستگاه کلونجر استخراج شد و شناسایی و میزان این اسانس با استفاده از دو روش گاز کروماتوگرافی جرمی و گاز کروماتوگرافی انجام شد. مهمترین ترکیب‌های موجود در اسانس میخک‌هندی به‌ترتیب اوژنول (۰/۸۷٪)، اوژنول استات (۹/۷۱٪)، آرومادندرن (۰/۶۷٪) و کایکول (۰/۳٪) بود. این اسانس بیشترین درصد بازدارندگی از رشد را روی قارچ *B. cinerea* داشت. به‌نحوی که در غلظت ۲۰۰ میکرولیتر در لیتر، به‌طور میانگین ۹۷٪ از رشد این قارچ جلوگیری کرد. ولی درصد بازدارندگی از رشد در همین غلظت روی قارچ *A. alternata* و *F. solani* به‌طور میانگین به‌ترتیب ۸۷٪ و ۸۴٪ بود. غلظت ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتر در لیتر اسانس بیش از ۹۵٪ و ۱۰۰٪ از رشد هر سه قارچ جلوگیری کرد. بهترین غلظت اسانس در جلوگیری از رشد قارچ‌ها روی بافت میوه‌ها برای قارچ *B. cinerea* در غلظت ۲۰۰ و برای دو قارچ دیگر در غلظت ۱۰۰۰ میکرولیتر در لیتر بود. خاصیت قارچ‌کشی اسانس میخک در اثر ترکیب‌های فنولی موجود در آن مثل اوژنول است. در نتیجه ما نشان دادیم که اسانس *Syzygium aromaticum* به‌طور مؤثری علیه بیماری‌های پس از برداشت کاربرد دارد و از خاصیت ضدعفونی‌کننده آن می‌توان در بخش بیماری‌شناسی گیاهان استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: اسانس، قارچ، بازدارندگی از رشد، اوژنول.

### مقدمه

کل تولید را در کشورهای صنعتی و پیشرفته و اغلب بیشتر از ۵۰٪ کل محصول را در کشورهای در حال توسعه شامل شود (فتحی، ۱۳۸۸). میوه‌ها، به علت اسیدیته بالا، رطوبت زیاد و نوع ترکیب مواد غذایی و زخم‌های ناشی از برداشت و حمل و نقل، مستعد حمله عوامل قارچی می‌باشند. از طرفی نیز پایین بودن pH در آنها باعث حساسیت ویژه آنها به

میوه‌ها و سبزی‌ها از مهمترین منابع غذایی بشر و در حقیقت تأمین‌کننده ویتامین‌های مورد نیاز بدن بوده و برای حفظ سلامتی انسان ضروری هستند (Shahi et al., 2003). ضایعات ناشی از بیماری‌های گیاهی در مزرعه، در طول دوره انبارداری، حمل و نقل و بازاریابی می‌تواند تا حدود ۲۵٪

پوسیدگی‌های قارچی می‌شود (Tournas & Katsounds, 2005). این عوامل موجب خسارت قابل توجهی به محصولات غذایی مختلف در کشورهای گرمسیری و معتدل می‌شوند (Varma & Dubey, 2001). البته استفاده از مواد شیمیایی به‌عنوان ابتدایی‌ترین روش کنترل بیماری‌های پس از برداشت، به علت سرطان‌زایی، دوره تجزیه طولانی، آلودگی محیط‌زیست و سایر اثرات سوء آنها روی مواد غذایی (مانند سمیت و ایجاد رایحه بد) و سلامتی انسان‌ها، محدود شده‌است (Tripathi et al., 2008).

از جمله روش‌های سالم و بی‌خطر برای کنترل بیماری‌های پس از برداشت، استفاده از ترکیب‌های طبیعی تحت عنوان عصاره طبیعی یا اسانس‌های گیاهیست. اسانس‌های گیاهی گستره وسیعی از متابولیت‌های ثانویه را شامل می‌شوند که در بیشتر حالات دارای خاصیت ضد میکروبی، آلوپاتی، آنتی‌اکسیدانی و زیست تنظیمی هستند. از نظر شیمیایی اسانس‌ها ترکیب‌های پیچیده‌ای هستند که انواع مختلف مواد شیمیایی شامل هیدروکربن‌ها، الکل‌ها، کتون‌ها، آلدئیدها و غیره در ترکیب‌های آنها وجود دارد. برخی اسانس‌های گیاهی و اجزای شیمیایی فعال آنها، دارای اثرات ضدباکتریایی بوده و به‌عنوان عوامل ضد میکروبی استفاده می‌شوند (Abbasi et al., 2009; Ferrante et al., 2007).

میخک‌هندی (*Syzygium aromaticum* L.) درختی همیشه سبز از خانواده Myrtaceae است که غنچه‌های خشک شده آن بسیار معطر می‌باشد. این گیاه بیشتر در مناطق اندونزی، ماداگاسکار، هند، سریلانکا و ایسلند وجود دارد (Alam et al., 2007). این گیاه به‌صورت سنتی به‌عنوان دارو برای بیماری تنگی نفس و انواع حساسیت کاربرد دارد. میخک علاوه بر این دارای خاصیت ضدسرطانی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشد (Kim et al., 1998).

به‌طور کلی در مطالعات مختلف انجام شده روی فرآورده‌های میخک فعالیت‌های ضد قارچی (Yahyazadeh et al., 2008)، ضدباکتریایی (Oussalah et al., 2006)، آنتی‌اکسیدانی (Misharina & Samusenko, 2008)، نماتدکشی (Sangwan et al., 1990)، ویروس‌کشی (Chaieb

### مواد و روش‌ها

جداسازی و خالص‌سازی قارچ عامل بیماری

برای جداسازی قارچ‌های بیماری‌زای *Alternaria alternata*، *Botrytis cinerea* و *Fusarium solani* از میوه‌های مشکوک به علائم این بیماری‌های قارچی در انبارداری‌های سطح شهرستان خرم‌آباد در سال ۹۵-۱۳۹۴ شمسی نمونه‌برداری انجام شد. برای جداسازی عوامل بیماری‌زا از میوه‌های مشکوک به آلودگی، ابتدا ناحیه مرز بین بافت سالم و آلوده به تکه‌های ۵-۴ میلی‌متری خرد و بعد با استفاده از هیپوکلریت سدیم ۱٪ ضدعفونی سطحی شدند و در تشتک‌های پتری حاوی محیط‌های غذایی سیب‌زمینی، دکستروز و آگار کشت داده شدند. پرگنه‌های رشد کرده که مشخصات قارچ‌های مورد نظر را داشتند، از طریق روش تک‌اسپور کردن برای قارچ‌های *A. alternata* و *B. cinerea* و کشت نوک ریشه برای قارچ *F. solani* خالص‌سازی شدند. در نهایت برای شناسایی جدایه‌های

میخک بود. تا کامل شدن رشد قارچ در تیمار شاهد قطر پرگنه‌های قارچی اندازه‌گیری شد. به منظور بررسی ویژگی قارچ کشی یا قارچ ایستایی اسانس‌ها، حلقه میسلومی تیمارهایی که رشد قارچی در آنها مشاهده نشد، روی محیط کشت PDA دوباره کشت شدند و رشد یا عدم رشد قارچ روی محیط کشت پس از یک هفته بررسی شد. درصد بازدارندگی اسانس‌ها و مواد مؤثره آنها با استفاده از فرمول زیر (Deans & Svoboda, 1990) محاسبه شد:

$$IP = \frac{dc - dt}{dc} \times 100$$

در این رابطه، IP درصد بازدارندگی از رشد، dc میانگین قطر رشد قارچ در تیمار شاهد (سانتی‌متر) و dt میانگین قطر رشد قارچ در تیمار مورد نظر (سانتی‌متر) می‌باشد.

#### فعالیت ضدقارچی اسانس روی بافت میوه

آزمایش اثر اسانس بر بافت میوه‌های سالم و تقریباً یک‌دست و سوسپانسیون اسپور با غلظت  $10^6$  اسپور در میلی‌متر (تعیین غلظت اسپور با استفاده از لام هماتوسیتمتر یا گلبول شمار) انجام شد (درویش‌نیا و همکاران، ۱۳۹۴). ابتدا میوه‌ها زیر جریان ملایم آب به مدت ۱۰ دقیقه شستشو داده شد و پس از خشک شدن برای تزریق سوسپانسیون اسپوری در تعداد کافی به زیر هود (لامینارفلو) منتقل شدند. سوسپانسیون اسپوری که از قبل تهیه شده بود به مقدار ۱۰ میکرولیتر با سمپلر برداشته و درون 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 گل میخک در غلظت‌های صفر (شاهد) و غلظت MIC سوسپانسیونی در آب مقطر استریل تهیه شد که از توئین ۸۰٪ به‌عنوان سورفاکتانت اسانس در آب مقطر استفاده شد. سپس روی میوه‌ها اسپری‌پاشی شد. به‌منظور تأمین رطوبت مورد نیاز، ۲۰CC آب مقطر درون ظرفی ریخته و داخل ظرف میوه گذاشته شد. سپس درب جا میوه‌ای را کاملاً بسته

قارچی عامل بیماری در حد گونه، از مقالات و کلیدهای شناسایی معتبر استفاده شد (Nelson et al., 1983؛ Mirzaei et al., 2007؛ Simmons, 2007).

#### تهیه میوه

میوه‌های سالم توت‌فرنگی، سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی و کیوی 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.

#### تهیه اسانس میخک

اسانس گل درخت میخک‌هندی به روش تقطیر با آب توسط دستگاه کلونجر طی سه ساعت گرفته شد. به این صورت که ابتدا ۱۰۰ گرم از گل میخک خشک‌شده را در بالن ریخته و بعد ۹۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به آن اضافه شد. آنگاه اسانس تهیه شده توسط سدیم‌سولفات آبدگیری و در ظروف شیشه‌ای تیره با روپوش پارافیلیم و ورقه آلومینیومی در دمای چهار درجه سانتی‌گراد در یخچال تا زمان آنالیز اسانس و آزمون بیولوژیک نگهداری شد (جایمند و رضایی، ۱۳۹۰).

#### سنجش فعالیت ضد قارچی اسانس گیاه میخک در شرایط آزمایشگاه

بدین‌منظور از روش تدخینی استفاده شد. بدین صورت که ابتدا یک حلقه میسلومی از حاشیه کشت‌های جدایه‌های قارچی در مرکز هر ظرف پتری حاوی PDA قرار داده شد و بعد در درب ظروف پتری، کاغذ آغشته به غلظت‌های مختلف اسانس قرار گرفت. فضای بین پتری‌ها به وسیله پارافیلیم مسدود و به‌حالت وارونه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس انکوباته شدند (درویش‌نیا و همکاران، ۱۳۹۴). این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در تیمارهای غلظت‌های صفر، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر روی قارچ‌های بیماری‌زا در چهار تکرار انجام شد. تیمار شاهد در این آزمایش غلظت صفر اسانس

جداسازی ترکیب‌ها در ستون موئین سیلیکای گذاخته از نوع BP-X5 (5% Phenyl 95% Methylpolysiloxan) با ابعاد قطر داخلی ۰/۲۲ میلی‌متر، ضخامت فیلم نازک ۰/۲۵ میکرومتر و طول ۳۰ متر انجام گردید.

### نتایج

گل میخک‌هندی حاوی مقدار زیادی اسانس بود، به طوری که به ازای هر ۱۰۰ گرم گل میخک خشک شده به طور میانگین حدود ۵CC اسانس با استفاده از دستگاه کلونجر بعد از آبگیری با سدیم سولفات بدست آمد. شناسایی ترکیب‌های موجود در اسانس این گیاه با استفاده از GC و GC-MAS انجام شد.

در مجموع در اسانس گل میخک‌هندی، ۱۲ ترکیب مشتمل بر ۹۸/۱٪ اجزای اسانسی شناسایی شد. بیشترین ترکیب شناسایی شده در این اسانس به ترتیب اوژنول (۸۷/۱٪) و اوژنول استات (۹/۷٪) بود. سایر ترکیب‌های مهم شامل آرومادندرن و کایوکول بود (جدول ۱).

و در محیط آزمایشگاه با دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از آنکه در میوه‌های شاهد علائم به صورت کامل (۱۰۰٪) ظاهر شد، یادداشت‌برداری از نمونه‌ها انجام شد. به این صورت که هر میوه به ۸ قسمت مساوی تقسیم و هر قسمت معادل ۱۲/۵٪ در نظر گرفته شد. در نهایت قطعات سالم و آلوده میوه‌ها شمارش و یادداشت شد (درویش‌نیا و همکاران، ۱۳۹۴).

### تجزیه و تحلیل آماری

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

### آنالیز اسانس

جداسازی، اندازه‌گیری و شناسایی ترکیب‌ها توسط دستگاه GC شرکت Shimudzu مدل GC-17A مجهز به آشکارساز طیف‌سنج جرمی مدل MS-QP5050، انجام شد.

جدول ۱- نوع و درصد مواد شناسایی شده در اسانس گل میخک‌هندی

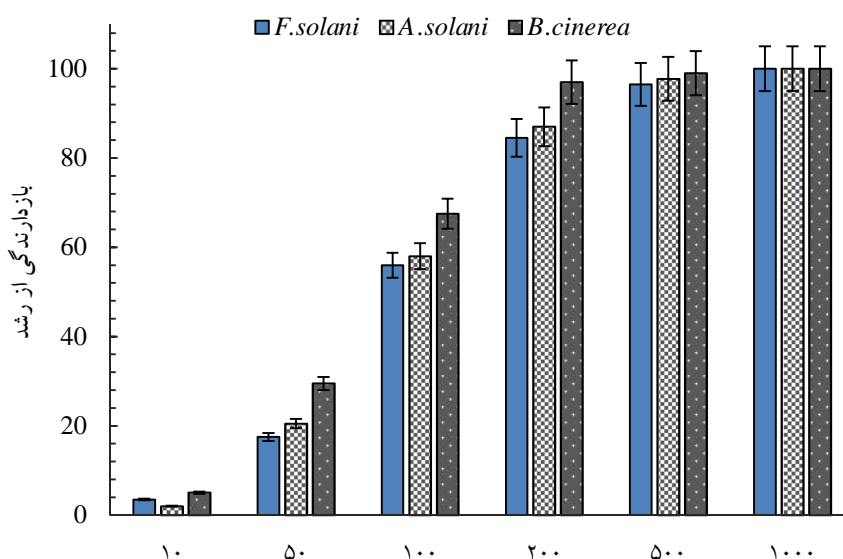
مقدار (%)	درصد تشابه	t'R (A)	RI (Calc)	RI (STD)	نام ترکیب‌ها
۰/۰۳	۹۵	۴/۷۷	۸۹۸	۸۸۹	2-heptanone
۰/۰۲	۹۴	۸/۳۷	۱۰۹۹/۳۸	۱۰۹۱	2-nonanone
۰/۰۳	۹۰	۸/۵۹	۱۱۰۷/۵۸	۱۰۹۸	linalool
۰/۳۰	۹۳	۱۳/۳۹	۱۲۶۵/۳۰	۱۲۵۳	chavicol
۰/۱۱	۹۳	۱۶/۷۰	۱۳۵۶/۲۰	۱۳۵۰	-terpinyl acetate
۸۷/۰۹	۹۰	۱۷/۸۱	۱۳۸۵/۰۰	۱۴۰۸	Z-isoeugenol
۰/۶۸	۹۱	۱۹/۸۶	۱۴۳۸/۰۷	۱۴۳۹	aromadendrene
۰/۱۰	۹۵	۲۱/۲۸	۱۴۷۴/۱۱	۱۴۶۷	-caryophyllene
۰/۰۱	۹۲	۳۰/۸۳	۱۵۶۸/۰۱	۱۵۸۲	-caryophyllene oxide
۰/۰۱	۹۳	۸/۹۳	۹۲۴/۱۵	۹۳۲	-pinene
۰/۰۲	۹۵	۲۸/۹۴	۱۵۲۶/۸۴	۱۵۴۱	-cadinene
۹/۷۱	۹۵	۲۳/۶۸	۱۵۳۵/۱۱	۱۵۳۶	eugenol acetate

رشد قارچ تفاوت معنی‌داری با هم نشان ندادند. در مورد تأثیر بازدارندگی اسانس روی قارچ *B. cinerea* در غلظت ۲۰۰ میکرولیتر در لیتر نیز با غلظت ۵۰۰ میکرولیتر در لیتر تفاوت معنی‌داری نشان نداد که این بدان معناست که این اسانس بیشترین درصد بازدارندگی از رشد را روی قارچ *B. cinerea* دارد. به‌نحوی که در غلظت ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ میکرولیتر در لیتر این اسانس، به‌طور میانگین ۶۷٪، ۹۷٪ و ۹۹٪ از رشد این قارچ جلوگیری کرد. ولی درصد بازدارندگی از رشد در این غلظت‌ها روی قارچ *A. alternata* به‌ترتیب ۵۸٪، ۸۷٪ و ۹۷/۷۵٪ و روی قارچ *F. solani* به‌طور میانگین ۵۶٪، ۸۴٪ و ۹۶/۵۰٪ بود (جدول ۲ و شکل ۱).

بررسی اثرات ضدقارچی اسانس گل میخک در شرایط آزمایشگاه روی محیط کشت مصنوعی نشان داد که این اسانس روی هر سه قارچ *A. alternata* و *B. cinerea*، *F. solani* خاصیت بازدارندگی از رشد قوی دارد. به‌طوری که در غلظت ۵۰۰ میکرولیتر در لیتر اسانس، بیش از ۹۵٪ از رشد هر سه قارچ جلوگیری بعمل آمد. تجزیه واریانس داده‌های موجود نشان داد که اثر بازدارندگی از رشد اسانس گل میخک روی هر سه قارچ مزبور در سطح ۱٪ آماری معنی‌دار است. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که با افزایش غلظت اسانس درصد بازدارندگی از رشد قارچ نیز افزایش می‌یابد. البته غلظت‌های بالاتر از ۵۰۰ میکرولیتر در لیتر از این اسانس از لحاظ کاهش

جدول ۲- تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس گل میخک روی رشد قارچ‌های انباری در شرایط آزمایشگاه

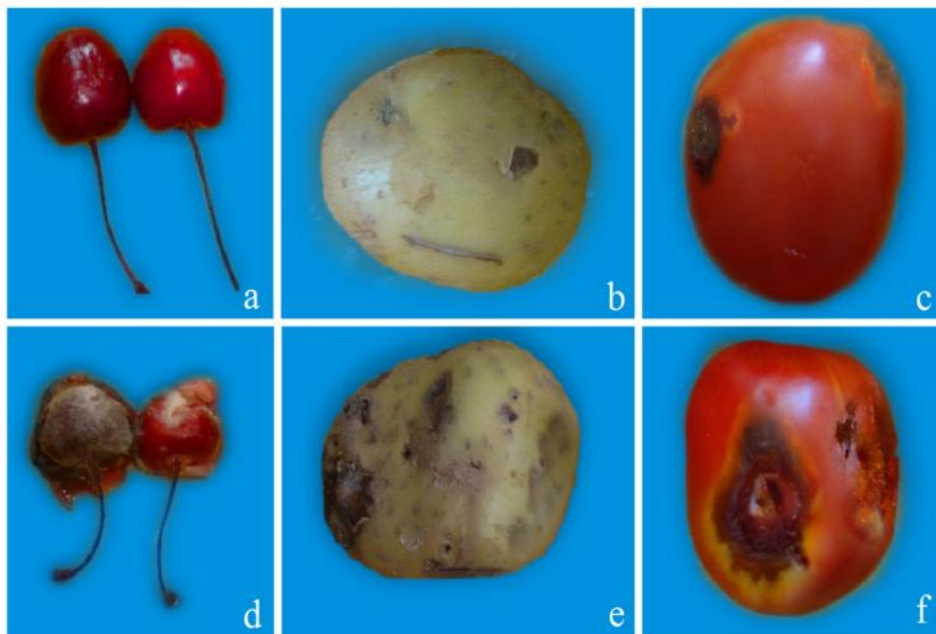
میزان رشد قارچ (Cm)			غلظت
<i>F. solani</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>A. alternata</i>	(میکرولیتر در لیتر)
۵/۰۰e	۵/۰۰d	۵/۰۰e	صفر (شاهد)
۴/۹۰e	۴/۷۵d	۴/۸۳e	۱۰
۳/۹۸d	۳/۵۳c	۴/۱۳d	۵۰
۲/۱۰c	۱/۶۳b	۲/۲۰c	۱۰۰
۰/۶۵b	۰/۱۵a	۰/۷۸b	۲۰۰
۰/۱۱a	۰/۰۵a	۰/۱۸a	۵۰۰
۰/۰۰a	۰/۰۰a	۰/۰۰a	۱۰۰۰



شکل ۱- تأثیر اسانس میخک در غلظت‌های مختلف (میکرولیتر در لیتر) روی میانگین بازدارندگی از رشد قارچ

آلوده خشکیده و مومی می شود (شکل ۲-۲). قارچ *A. alternata* به صورت لکه‌های سیاه‌رنگ و دوده‌ای از محل تلقیح قارچ به بافت میوه نمایان شد که به مرور این لکه‌ها گسترش پیدا کردند و بافت میوه را از بیرون و داخل از بین بردند (شکل ۲-۲). همان طور که در شکل ۲ مشخص است اسانس گیاه میخک با قدرت بازدارندگی خود از رشد این قارچ‌ها تا حدود زیادی روی بافت میوه‌ها جلوگیری بعمل آورد.

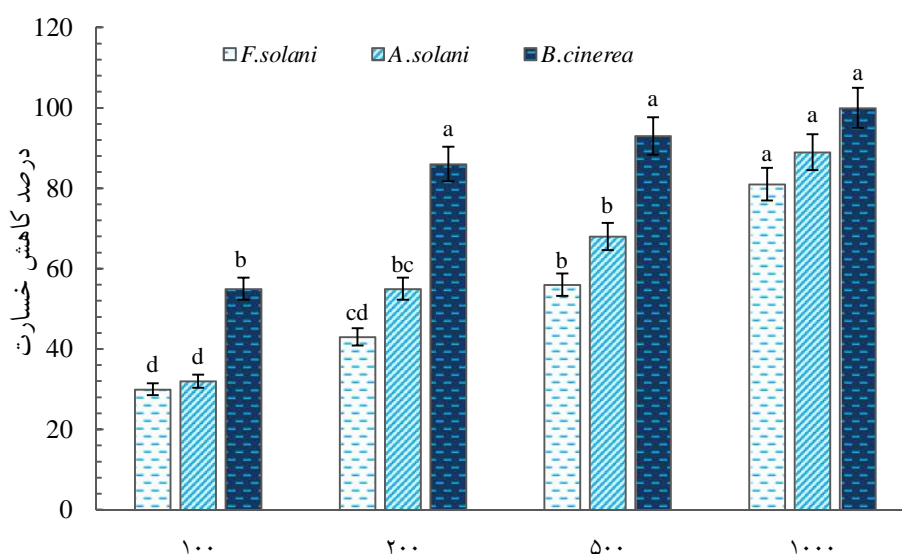
خسارت قارچ‌های موجود روی بافت میوه‌ها به این صورت بود که قارچ *B. cinerea* پوشش کرکی و خاکستری رنگی روی میوه ایجاد کرد که بافت زیر این کپک کاملاً لهیده شده و از بین رفت (شکل ۲-۲). قارچ *F. solani* لکه‌های قهوه‌ای ریزی روی غده سیب‌زمینی پدید آورد که این لکه‌ها به کنده‌ی پیشروی می‌کردند. پوسته روی لکه‌ها فرورفته، چروکیده و مرکز آنها گاهی در اثر مردن بافت خشکیده شد. در نهایت قسمت‌های



شکل ۲- مقایسه بافت میوه‌های آلوده‌شده به قارچ (d-f) با میوه‌های آلوده تحت تیمار اسانس گل میخک (a-c)

قارچ *B. cinerea* به‌طور میانگین ۵۵٪، ۸۶٪، ۹۳٪ و ۱۰۰٪ جلوگیری بعمل آمد. همه غلظت‌های بکار گرفته شده در کاهش خسارت عوامل قارچی روی بافت میوه گوجه‌فرنگی، گیلاس و سیب‌زمینی تفاوت معنی‌داری را در سطح ۱٪ آماری با شاهد آلوده نشان دادند. بهترین غلظت اسانس در جلوگیری از رشد قارچ‌ها روی بافت میوه‌ها برای قارچ *B. cinerea* در غلظت ۲۰۰ میکرولیتر در لیتر و برای دو قارچ دیگر در غلظت ۱۰۰۰ میکرولیتر در لیتر است (شکل ۳).

تجزیه واریانس اثر اسانس گل میخک در بازدارندگی از رشد قارچ‌های *A. alternata* و *B. cinerea* *F. solani* روی بافت میوه و کاهش خسارت آنها تفاوت معنی‌داری را در سطح ۱٪ آماری نشان داد. با افزایش غلظت اسانس رشد قارچ و در نهایت خسارت آن روی بافت میوه کاهش یافت. به‌نحوی که در غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتر در لیتر اسانس گل میخک از رشد قارچ *F. solani* به ترتیب ۳۰٪، ۴۳٪، ۵۶٪ و ۸۱٪، قارچ *A. alternata* به‌طور میانگین ۳۲٪، ۵۵٪، ۶۸٪ و ۸۹٪ و



شکل ۳- تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس میخک (میکرولیتر در لیتر) بر کاهش خسارت قارچ روی بافت میوه

## بحث

استفاده از ترکیب‌های طبیعی و اسانس‌های گیاهی به‌منظور جایگزین سموم و مواد شیمیایی برای کنترل و مدیریت بیماری‌های پس از برداشت میوه و سبزی به‌عنوان روشی بیولوژیک در سال‌های اخیر کاربرد فراوانی پیدا کرده است و به‌عنوان روشی مؤثر و در عین حال ایمن توجه بسیاری از محققان را به خود جلب کرده است.

در این پژوهش اسانس میخک‌هندی روی بازدارندگی از رشد قارچ‌های انباری *F. solani*، *A. alternata* و *B. cinerea* تأثیر بسزایی داشت، اما دامنه تأثیر غلظت‌های مختلف آن روی این قارچ‌ها متفاوت بود. پیش از این نیز فعالیت ضدقارچی، ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی در اسانس و عصاره میخک و ترکیب‌های مشتق شده از آن به اثبات رسیده است (Serrano et al., 2008). نتایج تجزیه اسانس گیاهی استفاده شده در این پژوهش نشان داد که ترکیب‌های اسانس میخک شامل ۸۷/۰۹٪ اوژنول، ۹/۷۱٪ اوژنول استات، ۰/۶۸٪ آرومادندرن، ۰/۳٪ کایپکول، ۰/۱۱٪ تریفنول استات، ۰/۱٪ کاربوفیلن، ۰/۰۳٪ لینالول، ۰/۰۳٪ هپتانول و ۰/۰۲٪ نونانول می‌باشد که با نتایج بدست آمده از سایر پژوهش‌ها در مورد ترکیب‌های موجود در اسانس

میخک‌هندی تقریباً مطابقت دارد (Lee & Shibamoto 2001؛ Alam et al., 2007). اغلب این ترکیب‌ها خاصیت میکروبی‌کشی دارند و باعث بازدارندگی از رشد قارچ‌های کپکی در محیط کشت و روی بافت میوه‌های گوجه‌فرنگی، سیب‌زمینی و گیلاس می‌شود. اسانس‌های شامل ترکیب‌های عمده فنولی، بیشترین فعالیت را علیه میکروارگانیسم‌ها نشان می‌دهند و اسانس میخک از آن جمله است (Vesaltalab & Gholami, 2010). اوژنول به‌عنوان یک ترکیب فنولی فعال از اسانس گل میخک جدا شده است و این ترکیب دارای خواص ضد میکروبی می‌باشد (Sangwan et al., 1990). در پژوهش مشابه دیگری بیان شده است که بخش اصلی ترکیب‌های اسانس میخک‌هندی علاوه بر اوژنول که یک ترکیب فنولی است شامل تانن‌ها و فلاونوئیدها می‌باشد. تحقیقات متعددی در مورد اثر ضدقارچی فلاونوئیدها در گذشته انجام شده است، از این‌رو احتمال دارد که این خاصیت ضدقارچی به دلیل وجود فلاونوئید در این گیاه نیز باشد (Evans, 1996). البته بهترین منابع آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، ترکیب‌های فنولی موجود در نمونه‌های گیاهیست (Dormana et al., 2003). ویژگی آنتی‌اکسیدانی ترکیب‌های فنولی عمدتاً ناشی از قدرت احیاءکنندگی و ساختار

اسانس میخک با جلوگیری از رشد قارچ‌های آزاد، تشکیل کمپلکس با یون‌های فلزی و خاموش کردن مولکول‌های اکسیژن با پیوند یگانه و سه‌گانه کرده است و از این طریق باعث حفاظت بافت‌های گیاهی در مقابل عوامل بیماری‌زا می‌شوند (Ghaderi et al., 2011).

در این پژوهش مشخص شد که غلظت‌های مختلف اسانس در میزان بازدارندگی از رشد میسلیمی قارچ و خاصیت قارچ‌کشی نقش کلیدی و مهمی دارد. همچنین با توجه به نوع قارچی که تحت تأثیر اسانس قرار گرفته است، این خاصیت می‌تواند متفاوت باشد. در واقع فعالیت اسانس‌ها در مقابل میکروارگانیسم‌ها با توجه به نوع اسانس و نژاد میکروبی متفاوت است؛ اما همیشه به مقدار اسانس بستگی دارد (Kalemba & Kunicka, 2003). البته مشخص شده است که فعالیت قارچ ایستایی اسانس میخک‌هندی در غلظت‌های پایین و قارچ‌کشی در غلظت‌های بالاتر رخ می‌دهد (Shahi et al., 2003).

همچنین در این پژوهش خاصیت بازدارندگی از رشد اسانس میخک‌هندی روی قارچ *B. cinerea* بیشتر از قارچ *A. alternata* و *F. solani* بود. به نحوی که می‌توان حداقل غلظت بازدارنده این اسانس را روی *B. cinerea* در غلظت ۲۰۰ میکرولیتر در لیتر تعریف کرد. این در حالیست که برای دو قارچ دیگر این میزان در غلظت‌های بالاتر از ۵۰۰ میکرولیتر در لیتر تعریف می‌شود در مطالعات مختلف انجام شده روی فرآورده‌های میخک فعالیت‌های ضدقارچی این گیاه به اثبات رسیده است (Yahyazadeh et al., 2008). در پژوهش مشابهی غلظت ۵۰ ppm اسانس میخک ۷۷/۰۴٪ بازدارندگی رشد میسلیمی نشان داد و غلظت ۴۵۰ ppm و ۶۰۰ ppm اسانس میخک کاملاً از رشد قارچ *B. cinerea* جلوگیری کرد (Vesaltalab & Gholami, 2010). فعالیت ضدقارچی قوی اسانس میخک در بین تعداد زیادی از اسانس‌ها عملکرد بهتر این اسانس را نسبت به سایر اسانس‌های بکار گرفته شده در جلوگیری از رشد قارچ‌های *B. cinerea* و *Alternaria porri* نشان داده است (Shahi et al., 2003; Wilson et al., 1997).

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که اسانس گل میخک حاوی مقادیر بسیار زیادی از ترکیب‌های فنولی ضدقارچی از جمله اوژنول می‌باشد که این اسانس با وجود این ترکیب‌ها اثر بازدارندگی قوی روی سه قارچ انباری *A. alternata*، *B. cinerea* و *F. solani* دارد. با توجه به این ویژگی، می‌توان از این اسانس و ترکیب‌های آن در جهت کنترل و کاهش خسارت این عوامل بیماری‌زا روی محصولات پس از برداشت استفاده کرد و می‌تواند جایگزین مناسبی برای بکارگیری سموم و قارچ‌کش‌های شیمیایی باشد. با توجه به ارزان بودن و در دسترس بودن میخک‌هندی می‌توان از اسانس این گیاه در ضدعفونی انبارها و بسته‌بندی میوه‌ها استفاده کرد، بدون آنکه اثرات و باقیمانده مهمی برای مصرف‌کننده و محیط‌زیست داشته باشد.



- Hasanzadeh, H. and Aboutalebi A.H., 2012. Effect of rosemary and Indian clove essence, Putrescin, hot water treatment and thiabendazole fungicide on postharvest life on mango (*Manifera indica* c.v Langra). *Postharvest Technology of Horticultural Crops*, 1(3): 107-114.
- Kalembe, D. and Kunicka, A., 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10: 813-829.
- Kim, L.M., Lee, E.H., Hong, S.H., Song, H.J., Kim, S.H. and Shin, T.Y., 1998. Effect of *Synzgium aromaticum* extract on immediate hypersensitivity in rat. *Journal Ethnopharmacol*, 60: 125-131.
- Lee, K.G. and Shibamoto, T., 2001. Antioxidant property of aroma extract isolated from clove buds *Syzygium aromaticum* (L.). *Food Chemistry*, 74: 443-448.
- Mirzaei, S., Mohamadi Goltapeh, E. and Shams Bakhsh, M., 2007. Taxonomical studies on the genus *Botrytis* in Iran. *Journal of Agricultural Technology*, 3(1): 65-76.
- Misharina, T.A. and Samusenko, A.L., 2008. Antioxidant properties of essential oils from lemon grapefruit coriander clove and their mixtures. *Biochemistry and Microbiology*, 45: 438-442.
- Nelson, P.E., Toussoun, T.A. and Marasas, W.F.O., 1983. *Fusarium Species: an Illustrated Manual for Identification*. Pennsylvania State University Press, 193p.
- Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L. and Lacroix, M., 2006. Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat Science*, 73: 236-244.
- Park, K. and Shin, S.C., 2005. Fumigant activity of plant essential oils and components from garlic (*Allium sativum*) and clove bud (*Eugenia caryophyllata*) oils against the Japanese termite (*Reticulitermes speratus* Kolbe). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(11): 4388-4392.
- Plotto, A., Roberts, D.D. and Roberts, R.G., 2003. Evaluation of plant essential oils as natural postharvest disease control of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Acta Horticulturae*, 628: 737-745.
- Sangwan, N.K., Verma, B.S., Verma K.K. and Dhindsa, K.S., 1990. Nematicidal activity of some essential oils. *Pesticide Science*, 28: 331-335.
- Serrano, M., Martinez-Romero, D., Guillen, F., Valverde, J.M., Zapata, P.J., Castillo, S. and Valero, D., 2008. The addition of essential oils to MAP as a tool to maintain the overall quality of fruits. *Trends in Food Science and Technology*, 19: 464-471.
- ### منابع مورد استفاده
- جایمند، ک. و رضایی، م.ب.، ۱۳۹۰. دستگاه‌های تقطیر، روش‌های آزمون و شاخص‌های بازدارندگی در تجزیه اسانس. انجمن گیاهان دارویی، تهران. ۳۵۰ صفحه.
- فتحی، ز.، ۱۳۸۸. بررسی تأثیر برخی اسانس‌های گیاهی در کنترل بیماری‌های قارچی بعد از برداشت گیلاس و زردآلو. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، علوم باغبانی. دانشگاه ارومیه، ارومیه.
- درویش‌نیا، م.، رضایی‌نژاد، ع.ا. و دلفان، ب.، ۱۳۹۴. اثر اسانس مرزه خوزستانی، رشینگری، کارواکرول و قارچ‌کش بنومیل بر بازدارندگی رشد قارچ *Botrytis cinerea* عامل بیماری پوسیدگی خاکستری میوه. به زراعی، ۱۱۷(۲): ۵۴۰-۵۳۱.
- Abbasi, N.A., Iqbal, Z., Maqbool, M. and Hafiz, I.A., 2009. Postharvest quality of mango (*Mangifera indica* L.) fruit as affected by chitosan coating. *Pakistan Journal of Botany*, 41(1): 343-357.
- Alam, M.H., Murat, E., Siegfrie, N. and Hubert, K., 2007. Chemical composition and content of essential oil from the bud cultivated Turkish clove (*Syzygium aromaticum* L.). *BioResources*, 2(2): 265-269.
- Chaieb, K., Hajlaoui, H., Zmantar, T., Kahla-Nakbi, A.B., Rouabhia, M., Mahdouani, K. and Bakhrouf, A., 2007. The chemical composition and biological activity of clove essential oil *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. *Phytotherapy Research*, 21: 501-506.
- Deans, S.G. and Svoboda, K.P., 1990. The antimicrobial properties of marjoram (*Origanum majorana* L.) volatile oil. *Journal of Flavour and Fragrance*, 5: 187-190.
- Dormana, H.J.D., Peltoketo, A., Hiltunen, R. and Tikkanen, M.J., 2003. Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected lamiaceae herbs. *Food Chemistry*, 83: 242-255.
- Evans, C.W., 1996. *Trease and Evans Pharmacognosy*. London, 612p.
- Ferrante, A., Alberici, A. and Antonacci, S., 2007. Effect of promoter and inhibitors of phenylalanine ammonia-lyase enzyme on stem bending of cut gerbera flowers. *Acta Horticulturae*, 755: 471-473.
- Ghaderi, M., Mamashloo, S., Sadeghi Mahoonak, A.R. and Alami, M., 2011. Evaluation of antioxidant activity, reducing power and free radical scavenging of different extract of *Artemisia annua* L. *Journal on Plant Science Researches*, 21: 46-57.
- Ghani, A., Azizi, M. and Ebrahim Pourkumele, A., 2007. The effect of temperature and use of natural compound on storage of cherri (*Prunus avium* L.). *Journal of Agricultural. Science and technology. Especial Issue for Horticultural Sciences*, 57: 21-69.

- Microbiology, 68(3): 207-210.
- Vesaltalab, Z. and Gholami, M., 2010. The Effect of Clove Buds and Rosemary Extracts and Essences on Control of *Botrytis cinerea* Growth. Plant Production Technology, 11(2): 1-11.
  - Wenqiang, G., Shufen, L., Ruixiang, Y., Shaokun, T. and Can, Q., 2007. Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. Food Chemistry, 101: 1558-1564.
  - Wilson, C.L., Solar, J.M., EL-Ghaouth, A. and Wisniewski, M.E., 1997. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. Plant Disease, 81(2): 204-210.
  - Yahyazadeh, M., Omidbaigi, R., Zare, R. and Taheri, H., 2008. Effect of some essential oils on mycelial growth of *Penicillium digitatum* Sacc. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 24: 1445-1450.
  - Zokaee Khosroshahi, M.R., Esna-Ashari, M. and Ershadi, A., 2007. Effect of exogenous putrescent on postharvest life of strawberry fruit. Horticultural Science, 114: 27-32.
  - Shahi, S.K., Patra, M., Shukla, P.A.C. and Dikshit, A., 2003. Use of essential oil as botanical-pesticide against postharvest spoilage in *Mallus pumilo* fruits. BioControl, 48: 223-232.
  - Simmons, E.G., 2007. Alternaria: an identification manual. CBS, Utrecht 6: 1-775.
  - Tournas, V.H. and Katsoudas, E., 2005. Mould and yeast flora in fresh berries, grapes and citrus fruits. International Journal of Food Microbiology, 105(1): 11-17.
  - Tripathi, P. and Shukla, A.K., 2007. Emerging non-conventional technologies for control of postharvest diseases of perishables. Fresh Produce, 1(2): 111-120.
  - 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: 39-46.
  - Varma, J. and Dubey, N.K., 2001. Efficacy of essential oils of *Caesulia axillaris* and *Mentha arvensis* against some storage pests causing biodeterioration of food commodities. International Journal of Food

## Chemical composition and antifungal activity of *Syzygium aromaticum* L. essential oil

M. Moosavian<sup>1</sup> and M. Darvishnia<sup>2\*</sup>

1- Ph.D. Student of Plant Pathology, Faculty of Agricultural, Lorestan University, Khorramabad, Iran

2\*- Corresponding author, Department of Plant Protection, Lorestan University, Khorramabad, Iran,

E-mail: Mdarvishnia44@yahoo.com

Received: November 2016

Revised: January 2017

Accepted: May 2017

### Abstract

This research was aimed to study the effects of antifungal activity of cloves (*Syzygium aromaticum* L.) essential oil against three pathogens-*Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* and *Fusarium solani*-isolated from tomato, cherries and potatoes by adding the fungus to their medium and also identify antifungal activity of the essential oil as a food preservative against the pathogen. Essential oil was extracted by Clevenger-type apparatus and identification and amount of the essential oil was performed using chromatography–mass spectroscopy and gas chromatography. The most important components of the essential oil were isoeugenol (87.09%), eugenol acetate (9.71%), Aromadendrene (0.68%), Chavicol (0.3%), and Linalool (12.51%), respectively. Isoeugenol has the highest percentage of growth inhibitory on *B. cinerea*, so that, on average, 97% of the growth of this fungus was prevented at the concentration of 200  $\mu$ l/l. However, the growth inhibitory percentage at this concentration was calculated to be 87% and 94%, for *A. alternata* and *F. solani*, respectively. More than 95% and 100% of the growth of all three fungi was prevented at concentrations of 500 and 1000  $\mu$ l/l of essential oil. The best essential oil concentration to prevent the growth of fungi on fruit tissue was 200 $\mu$ l/l for *B. cinerea*, and 1000  $\mu$ l/l for two other fungi. Antifungal properties of *S. aromaticum* essential oil are due to phenolic compounds in it like eugenol. Our results clearly showed that *S. aromaticum* essential oil was effective against post-harvest diseases, and its antiseptic properties could be used in plant pathology.

**Keywords:** Essential oil, fungi, growth inhibition, eugenol.