فصلنامه (علمی – پژوهشی)

زیست شناسی تکوینی

سال دوازدهم، شماره ۳، تابستان ۱۳۹۹ ص.۶۰-۵۳

مقاله پژوهشی

مقایسه‌ی اثر نگهدارنده ماده موثره اکوتیپ‌های متفاوت گیاه زنیان (*Tracheyspermum ammi*) بر روی رشد قارچ‌های فاسد کننده مرکبات

عاطفه حبیبی رودباری، محدثه لاری پور*، فریبا شریف‌نیا

گروه زیست شناسی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

* Email: mlarypoor@yahoo.com

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۹۸

چکیده

هدف مقایسه‌ی محتوی شیمیایی ماده موثره ی جداسازی شده از گیاه زنیان (Tracheyspermum ammi) از سه منطقه‌ی رویشی ایران به عنوان نگهدارنده مرکبات بر رشد قارچ‌های Alternaria alternata، Penicillium digitatum، Aspergillus niger است. بعد از تهیه اسانس‌ها به روش تقطیر با آب با دستگاه کلونجر و آنالیز آن با دستگاه GC-MS ،اثرات ضد قارچی اسانس‌های اکوتیپ‌های مختلف گیاه زنیان با روش های دیسک دیفیوژن،حداقل غلظت مهار کنندگی،حداقل غلظت کشندگی و ۵۰ % مهار رشد قارچی تعیین گردید و با اثرات ضد قارچی عصاره و عرق این گیاه مقایسه شد. همه اسانس‌ها در روش دیسک دیفیوژن، هاله عدم رشد بیشتر از ۱۰ سانتی متر داشتند ولی شاهد رشد قارچ‌ها با عصاره و عرق زنیان بودیم.از تاثیرگذارترین اکوتیپ اسانس‌ها روی قارچ‌های مورد بررسی، اکوتیپ شیراز و کرمان برای آسپرژیلوس نایجر با MIC و MFC برابر ۱۲۵ و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر بود.کم ترین درصد مهار رشد مربوط به اسانس شیرازی برای قارچ آلترناریا آلترناتا و اصفهان برای قارچ آسپرژیلوس نایجر در غلظت‌های ۳۱/۲۵ تا ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به ترتیب بین (۵/۵۸ تا ۱۰۰ %) و (۵/۳ تا ۱۰۰ %) است. اسانس زنیان در مقایسه با عصاره و عرق این گیاه اثر ضد قارچی قابل ملاحظه‌ای روی قارچ‌های مورد بررسی دارد. بنابراین می‌توان امیدوار بود که درآینده با جایگزینی اسانس گیاه زنیان به جای داروهای ضدقارچی شیمیایی که همواره دارای اثرات جانبی زیادی می‌باشند به عنوان نگهدارنده مرکبات استفاده کرد.

کلیدواژه‌ها: میوه گیاه زنیان، اکوتیپ، اسانس، ضدقارچ، نگهدارنده، آلترناریا آلترناتا، آسپرژیلوس نایجر، پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم.

مقدمه

Pistacia مرکبات یکی از محصولات باغی مهم بوده و از نظر اقتصادی،مبادلات تجاری و اشتغال‌زایی در دنیا و ایران دارای اهمیت زیادی است.با توجه به مشکلات مربوط به آفات و بیماری های این محصول متناسب با اقلیم هر استان، در کیفیت مدیریت منابع و میزان تولید تأثیرگذار خواهد بود.مرکبات نیز مانند بسیاری از محصولات دیگر دارای چندین بیماری مخرب قرنطینه ای می باشد.شناسایی

سریع و دقیق علایم و تشخیص این بیماری ها در کنترل و مدیریت آنها بسیار حائز اهمیت می باشد.

بخش عمده‌ای از ضایعات محصولات باغی (میوه‌ها و سبزی‌ها) به دلیل حمله عوامل بیماری زای قارچی در طول زنجیره تولید در مراحل داشت، برداشت، نگهداری در سردخانه و فرآوری تا مصرف ایجاد می‌شوند.

اگر چه استفاده از ترکیبات شیمیایی نظیر قارچ‌کش‌های مصنوعی، هنوز هم به‌عنوان روش عمده و موثر کنترل بیماری‌های بعد از برداشت قلمداد می‌شود اما با این حال، استفاده از این مواد باعث بروز مشکلاتی چون مقاومت عوامل بیماری‌زای قارچی به قارچکش‌ها، تهدید سلامت انسان‌ها و آلودگی محیط‌زیست می‌شود. امروزه تمايل جهاني براي يافتن روش‌هاي جايگزين در كنترل ضايعات بعد از برداشت، با اولويت قرار دادن روش‌هاي سالم و جلوگيري از تأثيرات منفي و اثرهاي جانبي سموم در سلامتي انسان و نیز وجود مقاومت به قارچکش ها امکان استفاده از مواد شيميايي را كاهش داده است. امروزه آثار سوء مصرف مواد سمی شیمیایی بر همه ثابت شده و از این رو بسیاری از کشورهای دنیا به تولید محصولات ارگانیک و عاری از بقایای آلاینده های مضر شیمیایی روی آورده‌اند. با توجه به بالا رفتن دانش و آگاهی مصرف کنندگان در سال های اخیر، فشار ناشی از کاهش یا حذف مواد شیمیایی نگهدارنده مواد غذایی فزونی یافته و مقدمات حذف این قبیل از ترکیبات را فراهم آورده است. از طرفی نیاز مبرم به استفاده از جایگزین‌های طبیعی جهت افزودن به مواد غذایی در جهت جلوگیری از رشد قارچ‌ها و باکتری‌ها به طور قابل ملاحظه‌ای در حال گسترش است. اسانس هاي گياهي شامل تركيبات مختلف طبيعي هستند كه مي‌توانند شامل ۲۰ تا ۶۰ تركيب در غلظت‌هاي مختلف باشند. آن ها بوسيله ۲ يا ۳ تركيبي كه غلظت نسبتاً بالايي ۲۰ تا ۷۰ درصد نسبت به ساير تركيب‌ها دارند توصيف مي‌شوند[۱۸]. خواص ضد ميكروبي بطور مكرر در تعداد وسيعي از عصاره و اسانس‌هاي گياهي گزارش شده است و كوشش برآن بوده كه اين توليدات طبيعي به عنوان دسته‌بندي شيميايي جديد داروهاي ضد ميكروبي اين مشكل را بر طرف سازد. زنيان با نام علمي *Trachyspermum ammi* متعلق به خانواده چتريان مي‌باشد.اهميت گياه زنيان به علت اسانس و تركيب‌هاي موجود در اسانس آن است. از تركيب‌هاي عمده اسانس ميوه اين گياه، تيمول، ترپينن، فلاندرن، گروه پينن، گروه سيمن و ميرسن هستند كه عمدتاً از منوترپن‌هاي اكسيژنه مي‌باشند. سه قارچ آسپرژيلوس نايجر،آلترناريا آلترناتا و پني‌سيليوم ديجيتاتوم از قارچ‌های ساپروفيت معمول در هوا هستند كه تحت شرايط معمول به راحتی بر روی تركيبات آلی از جمله ميوه ها رشد می‌كنند وسبب فساد ميوه‌ها می‌شوند.از طرفی رشد برخی از اين قارچ‌ها بر روی ميوه‌ها تحت شرايط خاص منجر به ترشح مايكوتوكسين‌ها می‌شود كه به جهت صرفه جويی گاها باغداران اين ميوه‌ها را با نازل‌ترين قيمت به كارخانجات توليد آب ميوه و مربا و غيره می‌فروشند و كارخانجات هم بعنوان محصولات غذايی به مردم ارائه می‌دهند كه اين توكسين‌ها پس از مصرف به بدن انسان راه پيدا كرده واثرات جبران ناپذيری بر سلامت انسان می‌گذارند. با توجه به اهميت جهاني موضوع نگهداري و حمل و نقل ميوه‌هاو سبزي‌هاي برداشت شده بدون كمترين بقاياي شيميايي، انجام تحقيق حاضر را ضروری می‌سازد. هدف از اين پژوهش جلوگيری از ضايعات و افزايش عمر انباری مركبات و حفظ ثبات فيزيكی و شيميايی مثل:طعم،رنگ ،مزه و خصوصيات تغذيه ای ميوه و توليد محصولات ارگانيک با استفاده از اسانس گياه زنيان وهمچنين كاهش آسيب اقتصادی به باغداران می‌باشد. [۱۲،۱۷]

مواد و روش‌ها

در اين مطالعه تجربی ابتدا با مراجعه به عطاری ها گياه زنيان خريداری شد. برای استخراج اسانس با روش تقطير با آب با دستگاه كلونجر از بذر گياه ۵۰ گرم دانه خشک كه كاملا پودر شده‌اند همراه با ۵۰۰ ميلی ليتر آب مقطر درون بالن استفاده و مدت چهار ساعت حرارت داده كه در اثر حرارت، فشار بخار آب افزايش می‌يابد و غده‌های حاوی اسانس شكسته شده و اسانس همراه با بخار آب وارد مبرد می‌شود.در مبرد عمل ميعان صورت گرفته و قطرات اسانس

درون آب به صورت دو فاز مشخص به طرف لوله مدرج حرکت می‌کند که به دلیل سبک تر بودن اسانس نسبت به آب ،اسانس روی آب تجمع یافته و آب اضافی از طریق لوله رابط به بالن باز می‌گردد و با باز کردن شیر و خروج آب، اسانس جمع‌آوری می‌شود.[۴،۲۹]

ترکیبات بیوشیمیایی اسانس گیاه زنیان را با روش طیف‌سنجی جرمی و به کمک دستگاه GC-MS اندازه‌گیری می‌شود. این دستگاه برای شناسایی و تعیین مقدار فراکسیون‌های موادی است که حالت فعال دارند (مانند اسانس‌های گیاهی که نقطه جوش پایینی دارند). در این دستگاه اجزای یک مخلوط به ترتیب توسط یک ستون کروماتوگرافی از هم جدا می‌شوند و پس از حذف گاز حاصل،وارد منبع یونش طیف‌سنج جرمی می‌گردند و به واسطه تولید میدان‌های الکتریکی پر قدرت،اقدام به شناسایی کمی و کیفی اجزای مخلوط بر اساس نسبت بار الکتریکی به جرم آنها می گردد.حداکثر دمای ذوب نمونه‌ها برای این آنالیز حدود ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. در این دستگاه از ستون کروماتوگرافی برای جداسازی ترکیبات مختلف و از اسپکترومتر جرمی برای شناسایی اجزا جداسازی شده استفاده می‌گردد.

سوش استاندارد قارچ‌های *Alternaria alternata* PTCC5224، *Penicillium digitatum PTCC5251*، *Aspergillus niger* PTCC5010 از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران،مرکز کلکسیون میکروبی تهیه شد.

قارچ‌های آلترناریا آلترناتا، پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم، آسپرژیلوس نایجر در محیط پوتیتو دکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل کشت داده شدند [۹] .پس از رشد انبوه قارچ‌ها روی محیط، زیر هود میکروبیولوژی با ایجاد خراش بر سطح محیطکشت، قارچ‌ها را از سطح محیطکشت جداسازی کرده،سپس وارد سرم فیزیولوژی استریل حاوی ۰/۵ درصد توین ۸۰ (۹/. گرم سدیم کلرید در ۱۰۰۰ میلی‌لیترآب مقطر) کرده و برای جداسازی اسپور قارچ از تنظیف استریل یا کاغذ صافی رد کرده، محلولی حاوی اسپور قارچ حاصل می‌شود. برای تهیه سوسپانسیون استاندارد برای هر قارچ بر طبق مقالات ۵×۱۰^{۵} اسپور درهر میلی‌لیتر می‌باشد که با لام نئوبار شمارش شد و بعد استوک‌های مورد نظر تهیه گردید. اثرات ضد قارچی اسانس‌های اکوتیپ‌های مختلف گیاه زنیان با روش‌های دیسک دیفیوژن، حداقل غلظت مهار کنندگی، حداقل غلظت کشندگی و ۵۰ % مهار رشد قارچی تعیین گردید و با اثرات ضد قارچی عصاره و عرق این گیاه مقایسه شد.

برای تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل و مقایسه میانگین‌ها از نرم‌افزار SPSS16 و آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) استفاده گردید و اختلاف بین میانگین‌ها با آزمون Tukey در سطح اطمینان ۰/۰۵ >Pدرصد انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج مربوط به تجزیه کروماتوگرافی گازی-طیف سنج‌جرمی اسانس‌ها

سه ترکیب تیمول،پارا- سایمن و گاما-ترپینن ترکیبات اصلی و عمده اسانس گیاه زنیان محسوب می‌شوند که بین ۹۰ تا ۹۷ درصد ترکیبات شیمیایی اسانس را در اکوتیپ‌های مورد مطالعه تشکیل می‌دهند.اکوتیپ اصفهان بیشترین درصد تیمول و اکوتیپ کرمان بیشترین درصد پارا-سایمن و گاما-ترپینن را به خود اختصاص دادند. نتایج سنجش اجزای اسانس در جدول ۱ مشاهده می شود. [۲۲،۱۹]

جدول ۱.اجزای اسانس زنیان حاصل از GC-MS

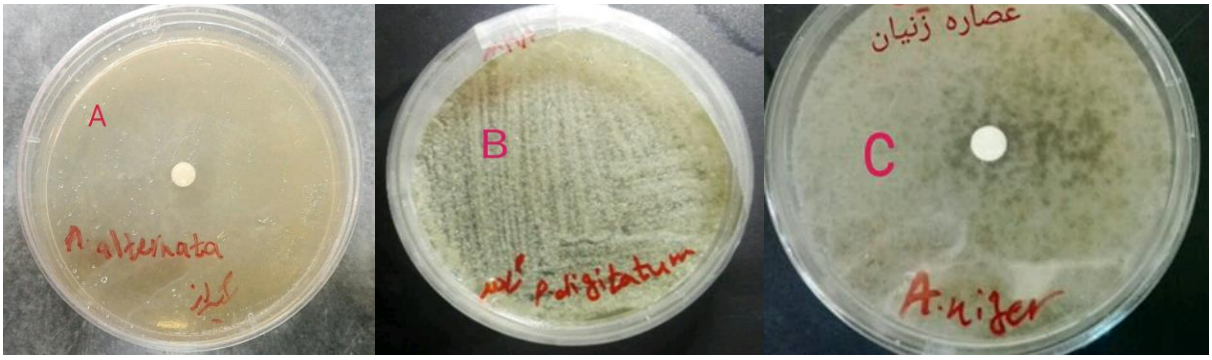
		alpha-Thujene	alpha-Pinene	Sabinene	beta-Pinene	Myrcene	para-Cymene	gamma-Terpinene	Thymol
اکوتیپ	شیراز	% ۰/۱۷	% ۰/۰۹	% ۰/۲۵	% ۱/۳۲	% ۰/۷۱	% ۱۸	% ۲۱	% ۵۷
	کرمان	% ۰/۱۲	% ۰/۲۲	% ۰	% ۰/۶۲	% ۰/۳۳	% ۱۹	% ۲۸	% ۵۱
	اصفهان	% ۰/۲۶	% ۰/۰۶	% ۰	% ۰/۳۴	% ۰/۴۸	% ۱۰	% ۱۴	% ۷۳

نتایج مربوط به دیسک دیفیوژن

تمامی اسانس‌ها بر روی هر سه گونه قارچ آلترناریا آلترناتا،آسپرژیلوس نایجر و پنی سیلیوم دیجیتاتوم مهار کامل داشتند و هاله عدم رشد بیشتر از ۱۰ سانتی متر می‌باشد.در پلیت‌های شاهد که به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شده‌اند بعد از گذشت ۲۴ ساعت از کشت قارچ، رشد دیده شد و هاله عدم رشد دیسک‌های دارویی کاملا قابل ملاحظه است.همین آزمایش با عصاره زنیان و عرق زنیان هم انجام شد که شاهد رشد قارچ‌ها بودیم.بنابراین قدرت مهار عصاره و عرق زنیان صفر و قدرت مهار اسانس اکوتیپ‌های مختلف زنیان بدون رقیق‌سازی، به قدری بالاست که هاله عدم رشد شامل کل پلیت می شود.[۳،۱۵،۲۷]

نتایج مربوط به حداقل غلظت مهارکنندگی رشدMIC

از میان قارچ‌ها، برای مهار رشد قارچ آلترناریا آلترناتا به غلظت بیشتری ازاسانس اکوتیپ‌های مختلف زنیان نیاز داریم در حالی‌که برای مهار قارچ‌های آسپرژیلوس نایجر و پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم به غلظت کمتری از اسانس اکوتیپ‌های مختلف گیاه زنیان نیاز داریم. نتایج MIC اسانس اکوتیپ‌های مختلف گیاه زنیان برای قارچ های تحت تیمار در جدول ۲ بیان شده است.



تصویر ۱.رشد قارچ با عصاره: (C) کنترل منفی: (B) کنترل مثبت:(A)

جدول ۲.نتایج MIC اسانس اکوتیپ های مختلف گیاه زنیان برای قارچ آلترناریا آلترناتا،آسپرژیلوس نایجر و پنی سیلیوم دیجیتاتوم. (غلظت های به کار رفته اسانس در تست میکرو دیلوشن (ug/ml))

اکوتیپ	غلظت اسانس / قارچ	۲۰۰۰ ug/ml	۱۰۰۰ Ug/ml	۵۰۰ Ug/ml	۲۵۰ Ug/ml	۱۲۵ Ug/ml	۶۲/۵ Ug/ml	۳۱/۲۵ Ug/ml	۱۵/۶۲ Ug/ml
شیراز	آلترناریاآلترناتا	-	-	+	+	+	+	+	+
	آسپرژیلوس نایجر	-	-	-	-	-	+	+	+
	پنی سیلیوم دیجیتاتوم	-	-	-	-	+	+	+	+
کرمان	آلترناریاآلترناتا	-	-	+	+	+	+	+	+
	آسپرژیلوس نایجر	-	-	-	-	-	+	+	+
	پنی سیلیوم دیجیتاتوم	-	-	-	-	+	+	+	+
اصفهان	آلترناریاآلترناتا	-	-	+	+	+	+	+	+
	آسپرژیلوس نایجر	-	-	-	-	+	+	+	+
	پنی سیلیوم دیجیتاتوم	-	-	-	-	+	+	+	+

- عدم رشد + رشد

نتایج مربوط به حداقل غلظت مهارکنندگی رشدMFC

از میان اکوتیپ‌های مورد بررسی، اسانس اکوتیپ‌های مختلف با MFC معادل ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کمترین اثر کشندگی بر روی قارچ آلترناریا آلترناتا را دارند و اکوتیپ های شیراز و کرمان با MFC معادل ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیشترین اثر کشندگی بر روی قارچ آسپرژیلوس نایجر را دارند. نتایج MFC اسانس اکوتیپ‌های گیاه زنیان برروی قارچ‌های تحت تیمار در جدول ۳ نشان داده شده است.

جدول۳. نتایج MFC اسانس اکوتیپ‌های گیاه زنیان بر روی قارچ‌های مورد بررسی(ug/ml)

اکوتیپ	قارچ تحت تیمار	ug/ml/MFC
شیراز	آلترناریا آلترناتا	۲۰۰۰
	آسپرژیلوس نایجر	۲۵۰
	پنی سیلیوم دیجیتاتوم	۵۰۰
کرمان	آلترناریا آلترناتا	۲۰۰۰
	آسپرژیلوس نایجر	۲۵۰
	پنی سیلیوم دیجیتاتوم	۵۰۰
اصفهان	آلترناریا آلترناتا	۲۰۰۰
	آسپرژیلوس نایجر	۵۰۰
	پنی سیلیوم دیجیتاتوم	۵۰۰

نتایج مربوط به مهار رشد قارچ آسپرژیلوس نایجر

میزان مهار رشد قارچ آسپرژیلوس نایجر توسط اسانس شیرازی در مجاورت غلظت‌های ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر در محدوده ی ۸/۳۵ تا ۱۰۰ درصد،اسانس اصفهان در محدوده ی ۵/۵۸ تا ۱۰۰ درصد و اسانس کرمان در محدوده ی۱۰ تا ۱۰۰درصد تعیین شد.

نتایج مربوط به مهار رشد قارچ پنی سیلیوم دیجیتاتوم

میزان مهار رشد قارچ پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم توسط اسانس شیرازی در مجاورت غلظت های ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر در محدوده ی ۸/۳ تا ۱۰۰ درصد، اسانس اصفهان در محدوده‌ی ۷/۷ تا ۱۰۰ درصد و اسانس کرمان در محدوده‌ی ۷/۹ تا ۱۰۰درصد تعیین شد.

نتایج مربوط به مهار رشد قارچ آلترناریا آلترناتا

میزان مهار رشد قارچ آلترناریا آلترناتا توسط اسانس شیرازی در مجاورت غلظت‌های ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در محدوده‌ی ۵/۳ تا ۱۰۰ درصد، اسانس اصفهان در محدوده‌ی ۸/۲۵ تا ۱۰۰ درصد و اسانس کرمان در محدوده‌ی ۷/۶ تا ۱۰۰درصد تعیین شد.جدول داده‌ها وارد نرم‌افزار spss شده و ارزش p و یا سطح معنی‌داری برای اسانس اکوتیپ شیراز گیاه زنیان در غلظت‌های بالاتر از۶۲/۵ ug/ml کارشده و با کنترل از نظر آماری در سطح کمتر از ۰/۰۵ بوده و معنی‌دار می‌باشد. (ANOVA, P<0/05).

مرکبات یکی از مهم‌ترین محصولات باغی است که آلودگی میوه‌ها به وسیله میکروارگانیسم‌ها در فاصله زمانی بین برداشت تا مصرف آنها در مناطقی که دما و رطوبت نسبی محیط بالا است به سرعت صورت می‌گیرد. قارچ‌ها از مهم‌ترین فاسد کننده‌های مرکبات هستند که با توجه به شرایط رشد مناسب (pH برابر با ۷)و دمای محیط (۲۵-۳۰ سانتی‌گراد) و رطوبت مناسب میوه‌ها پس از برداشت، آمادگی رشد روی مرکبات و فساد آنها را دارند.ازطرفی فساد میوه‌ها نه تنها محصولات را از زنجیره غذایی حذف می‌کند، بلکه آسیب اقتصادی به جامعه و دولت وارد می‌شود و در نتیجه‌ی کاهش میزان این میوه‌ها، نیاز به واردات میوه افزایش می‌یابد که منجر به خروج ارز از کشور می‌شود.[۱،۲]

از طرفی رشد برخی از این قارچ‌ها بر روی میوه‌ها تحت شرایط خاص منجر به ترشح مایکوتوکسین‌ها می‌شود که به جهت صرفه‌جویی گاها باغداران این میوه‌ها را با نازلترین قیمت به کارخانجات تولید آب میوه و مربا و غیره می‌فروشند و کارخانجات هم بعنوان محصولات غذایی به مردم ارائه میدهند که این توکسین‌ها پس از مصرف به بدن انسان راه پیدا کرده و اثرات جبران‌ناپذیری بر سلامت انسان می‌گذارند.

براي كنترل آلودگي‌هاي قارچي محصولات باغباني گاهي از محلول هاي قارچ كش استفاده مي شود كه براي سلامت انسان مضر هستند. با توجه به اهميت جهاني موضوع، انجام تحقیق حاضر ضروری می‌باشد. هدف از این پژوهش جلوگیری از آلودگی مرکبات و افزایش عمر مرکبات و حفظ ثبات فیزیکی و شیمیایی مثل:طعم،رنگ ،مزه و خصوصیات تغذیه‌ای میوه در انبارهای نگهداری میوه با استفاده ازاسانس گیاه زنیان است. همچنین کاهش آسیب اقتصادی برای جامعه و باغداران می‌باشد که در برخی از منابع از آن به عنوان آنتی‌بیوتیک نسل چهارم یاد شده است. [۲۳،۳۰] از این رو استفاده از منابع طبیعی از جمله گیاهان و میکروارگانیسم‌های مفید و متابولیت‌های تولید شده از آن‌ها به عنوان روش‌های ایمن و ارزان مورد توجه قرار گرفته‌اند. در بین گیاهان ، گیاهان دارویی به دلیل داشتن طیف گسترده‌ای از ترکیبات مفید توجه زیادی را به خود معطوف کرده اند و در سال‌های اخیر تحقیقات زیادی روی کاربرد گیاهان دارویی به ویژه اسانس و عصاره آن‌ها جهت جلوگیری از رشد قارچ‌ها و ممانعت از تولید توکسین متمرکز شده است.

با توجه به تفاوت ترکیبات شیمیایی اسانس اکوتیپ‌های مختلف گیاه زنیان، امکان بروز اثر ضد قارچی متفاوت از آن‌ها وجود دارد.در حالی که طی مطالعه‌ای ثابت شد که مقدار بالای تیمول در اسانس، عامل حتمی بر افزایش اثر ضد میکروبی آن نیست. در بررسی ترکیبات شیمایی گیاه زنیان اجزای اصلی آن تیمول، پارا- سایمن و گاما-ترپینن معرفی شدند. [۲]

براساس مطالعه‌ای توسط ویتالی و همکاران در سال ۲۰۱۵ بر روی اسانس میوه گیاه زنیان بومی بلوچستان، میزان اسانس بدست آمده از آن ۲/۷ درصد اعلام شد.۱۹ ترکیب که معادل ۹۹/۸ درصد کل ترکیبات موجود در اسانس بوده شناسایی گردید که ترکیبات تیمول، پارا- سایمن و گاما-ترپینن با مقادیر به ترتیب ۶۷/۴، ۱۷/۹ و ۱۱/۳ درصد بیشترین ترکیبات اسانس را تشکیل می‌دادند و ما بقی ترکیبات کمتر از ۱ درصد گزارش شدند. [۳۰]

مطالعه‌ای دیگر توسط عبدالحمید و همکاران در سال ۲۰۱۴ بر روی عصاره هگزانی و اسانس میوه گیاه زنیان در شهر طائف انجام گرفت.از میوه این گیاه ۱/۸ درصد اسانس تهیه گردید که ترکیبات گاما- ترپینن، تیمول و پارا- سایمن به ترتیب با مقادیر ۲۶۶/۲۸ ،۲۰۱/۹۷ و ۱۹۴/۹۱ میلی‌گرم به ازای هرگرم اسانس ،بیشترین ترکیبات اسانس مربوطه بودند. [۲۳] درمقایسه با تحقیق فوق در این تحقیق نیز سه ترکیب تیمول،پارا-سایمن و گاما-ترپینن ترکیبات اصلی و عمده اسانس گیاه زنیان محسوب می‌شدند که بین ۹۰ تا ۹۷ درصد ترکیبات شیمیایی اسانس را در اکوتیپ های مورد مطالعه تشکیل می‌دهند. اکوتیپ اصفهان بیشترین درصد تیمول و اکوتیپ کرمان بیشترین درصد پارا-سایمن و گاما-ترپینن را به خود اختصاص دادند.

در مطالعه‌ای که توسط شکری و همکاران در بررسی فعالیت ضدقارچی اسانس گیاه زنیان برروی قارچ‌های مختلف از جمله آسپرژیلوس انجام شده است، اسانس گیاه زنیان در غلظت های ۱-۰/۱ mg/ml، برای آسپرژیلوس MIC بین ۱-۱/۵ mg/ml و MFC ۲-۳ mg/ml را نشان داد.[۲۷]در این مطالعه میزان MICوMFC برای اکوتیپ اصفهان برای قارچ آسپرژیلوس معادل ۱۲۵ Ug/ml و ۲۵۰ Ug/ml گزارش شد که مناسب ترو کمتر گزارش شده است .در مطالعه‌ای که توسط سینگ و همکاران انجام شداثر ضد قارچی و آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره استونی گیاه زنیان مورد بررسی قرار گرفت که طی این مطالعه مشخص شد که اسانس گیاه زنیان با غلظت حدود ۶ میکرولیتر از آن ،اثر ضد قارچی مناسب‌تری برروی گونه‌های مختلف از جمله آسپرژیلوس و پنی سیلیوم دارد. [۲۸] نتایج این تحقیق با مطالعه ما همخوانی دارد.

اسانس زنیان در مقایسه با عصاره و عرق این گیاه اثر ضد قارچی قابل ملاحظه‌ای روی قارچ های مورد بررسی دارد. در این تحقیق بهترین نتیجه و برای برای اسانس اکوتیپ شیراز وکرمان برای قارچ آسپرژیلوس نایجر بدست آمد و MIC معادل ۱۲۵ Ug/ml و MFC معادل ۲۵۰ Ug/ml گزارش شد. بر اساس نتایج MIC معادل ۵۰۰ Ug/ml و MFC معادلUg/ml ۲۰۰۰ کمترین میزان تاثیر اسانس

زنیان بر روی قارچ رنگی آلترناریا الترناتا می‌باشد که به مقاومت قارچ در برابر ترکیبات ضد قارچی بر می‌گردد. این قارچ به دلیل داشتن ملانین در دیواره خود به شدت نسبت به عوامل ضدمیکروبی طبیعی و شیمیایی مقاومت نشان می‌دهد. از میان اکوتیپ‌های مختلف اکوتیپ اصفهان اسانس زنیان با بیشترین درصد تیمول کمترین اثر ضدقارچی را بر قارچ آلترناریا آلترناتا داشت ،در حالیکه بر روی رشد دو قارچ دیگر نتایج ایده آلی به جا گذاشت.اکوتیپ کرمان و شیراز با درصد تیمول کمتر اثر ضدقارچی مناسبی روی قارچ‌های مورد بررسی داشتند. در نتیجه با توجه به مقدار تیمول اسانس اکوتیپ کرمان و شیراز و اثر ضد قارچی قابل توجه آن‌ها و همچنین مقدار تیمول اسانس اکوتیپ اصفهان که بیشترین مقدار تیمول را دارد اما جز موثرترین اسانس‌ها از نظر اثر ضد قارچی نبوده است، پی به تاثیر دیگر مواد شیمیایی برده می‌شود. با توجه به اینکه یکی از مبانی اقتصادی ایران ،صادرات مرکبات است و سه قارچ تحت تیمار این تحقیق از بین برنده مرکبات می باشند،بنابراین یک ترکیب طبیعی،ارزان و بومی مانند زنیان با اثرات شدیدا ضد قارچی می‌تواند به عنوان نگهدارنده طبیعی و بدون اثرات سوء بر محیط زیست و انسان کاربرد داشته باشد.[۲۱،۲۸] نتایج این مطالعه نشان داد که با توجه به غلظت های به کار رفته در تست‌های مختلف این غلظت‌ها برای ساخت عامل ضد قارچی با ارزش می باشند.زیرا نسبت به قارچ‌کش‌های مصنوعی مقرون به صرفه بوده و اثرات زیست تخریب پذیری کمتری دارند.

منابع

[1] Abdel-hameed ES, Bazaid,S.A,Al zahrani,O,El-halmouch,Y,El-sayed,M.M,El-wakil,A.E. 2014; Chemical composition of volatile component, antimicrobial and anticancer activity of n-hexane extract and essential oil from Trachyspermum ammi L. seeds. Orient Journal chem. 30(4):1653-62.

[2] Astani A, Schnitzler, P. 2014; Antiviral activity of monoterpenes beta-pinene and limonene against herpes simplex virus in vitro. Iran Journal microbiol. 6(4):149-55

[3] Chowdhary A KS, Xu J, Meis J. 2013; Emergence of Azole-Resistant Aspergillus fumigatus Strains due to Agricultural Azole use creates an increasing threat to human health. PLOS Pathogens. 9(10).

[4] Gemeda N. 2014; Effect of essential oil on Aspergillus spore germination, growth and mycotoxin Production: a potentioal source of botanical food preservative. Asian pacific journal of tropical biomedicine. 4(1):373-81.

[5] Ghazi motlagh S, Jahanbakhsh V, Tehranifar A, Arooii H. 1393; Effect of some essential oils on sporulation germination and colony growth of penicillium digitatum in vitro culture conditions. journal of plant protection. 28(1):28-35.

[6] Hafezian M. 1394-95. Antimicrobial effect of Pycnocycla bashagardiana mozaff essence on six bacterial strains in three discrete plate, well plate and microplate methods.: Azad university. phamaceutical sciences branch.

[7] Hashemi E. 1394-95. Study of phytochemicals and antifungal effects of essential oil from militany aerial part of Mentha mozaffarianni of six fungal strains.: Azad university ,phamaceutical sciences branch.

[8] Jamalian A. 1390-91. The effect of medicinal plants of Babuneh ,Razianeh and Raee flower on growth of some human pathogen fungi from the Aspergillus, Fusarium and Dermatophyt groip. Azad university.science and research unit.

[9] Kashani H, Tabatabai yazdi F, Mortazavi SA, Shahidi F. 1394; Antifungal effect of water and ethanolic extracts of fruit of Tehran pine tree(pinuselderica) on Aspergillus niger and candida albicans. Quarterly journal of infections diseases and tropical medicine. 20(69):9-15.

[10] KazemiA O, A,Ashrafnejad,F,Sargheini,N,Mahdavi,R,Farshchian,M,R,Mahluji,S. 2014; Molad contamination of untreated and roasted with salt nuts (walnuts,peanuts and pistachio) sold at markets of tabriz,iran. Jundishapur journal of microbiology. 7(1).

[11] Khosravi A, Chabavizadeh J, Shokri H, Tajbakhsh H. 2009; Evaluation of the

sensitization of poultry workers to Aspergillus fumigatus and Cladophilophora carrionii Evaluation of the sensitization of poultry workers to Aspergillus fumigatus and Cladophilophora carrionii. J Mycol Med. 19:104-9.

[12] Lyratzopoulos G EM, Nerringer R, Denning DW. 2005; Invasive infection due to Penicillium species other than P. marneffei. J Infection. 45: 184-207.

[13] Maggii. F, Orsomando, G, Papa, F, Petrelli, D, Petrelli, R, Quassinti, L, Sorci, L, Majidzade, M, Bramucci, M,Vitali, L. 2016 .Diverse biological effect of the essential oil from Iranian Trachyspermum ammi. Arabian journal of chemistry.9:775-86.

[14] Moazeni M SM, Hosseini AA. 2012; In Vitro lethal effect of ajowan (Trachyspermum ammi L). Essential oil on Hydatid cyst protoscoleces. Veterinary Parasitology. 187:203- 8.

[15] Moghtader M, Salari, H, Farahmand, A. 2011; Evaluation of the antifungal effects of rosemary oil and comparison with synthetic borneol and fungicide on the growth of Aspergillus flavus. Journal EcolNatEnviron. 3:210-4.

[16] Murthy PS BB, Khanum H, Srinivas P. 2009; Inhibitory effects of ajowan (Trachyspermum ammi) ethanolic extract on A. ochraceus growth and ochratoxin production. Turk J Biol. 33:211-7.

[17] Myrcene.https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound. 2016 [Avialable at: National center for biotechnology.]

[18] Naeini A KA, Chitsaz M, Shokri H, Kamlnejad M. 2009; Anti-Candida albicans activity of some Iranian plants used in traditional medicine. Journal de Mycologie Mé dicale. 19:168-17.

[19] Paul S DR, Maheswari DK, Kang SC. 2011; Trachyspermum ammi (L). Fruit essential oil influencing on membrane Permeability and surface characteristics in inhibiting food-borne . Food Control. 22(5):725-31.

[20] Perumal P, Mekala S, Chaffin W. 2007; Role for cell density in antifungal drug resistance in Candida albicans biofilms. Antimicrob Agents Chemother. 5.63-1:2454.

[21] Qureshi AA KK. 2010; Phytochemical constituents and pharmacological activites of Trachyspermum ammi. Plant Archives. 10(2): 955-9.

[22] Ramalho T, Oliveira,M,Araujo lima,A,Dos santos,C,Piuvezam,M. 2015. Gamma-terpinene modulates acute inflammatory response in mice. planta med.

[23] Ramaswamy S SS, Sherief SH, Jaikumar S, Saravanan R, Prasadkumar C et al. 2010. Gastroprotective activity of ethanolic extract of Trachyspermum ammi Fruit Int J Pharama and Bio Science.1(1):7-15.

[24] Rezaei kahkha MR, Amanloo,S,Kaykhaii,M. 2014;Antiaflatoxigenic activity of carum capticum essential oil. Environmental chemistry letters. 12:231-4.

[25] Rowe RC SP, Quinn ME. 2009.Handbook of pharmaceutical Excipients. ed t, editor. UK: RPS Publishing.

[26] Shan B, Zhong cai Y, Brooks J, Corke H. 2007. Antibacterial Properties and Major Bioactive Component of Cinnamon Stick (Cinnamomum burmannii): Activity against Foodborne Pathogenic Bacteria. Journal of Agricural and Food Chemistry. 5484-90.

[27] Shokri H, Sharifzadeh, A, Khosravi, A.R. 2016;Antifungal activity of the Trachyspermum ammi essential oil on some of the most common fungal pathogense in animal. Iranian journal of veterinary medicine. 10(3):173

[28] Singh MK SN. 2011.Comparison of antimicrobial activity of herbs & spices and their phytochemical determination. Int J Green Pharmacy;5(3):229-35.

[29] Valente J, Zuzarte, M, Liberal, J, Goncalves, M.J, Lopes, M.C, Cavaleiroa, C. 2013; Margotia gummifera essential oil as a source of anti-inflammatory drugs. industrial crops and products. 47:86-91.

[30] Vitali LA BD, Biapa O, Cappellacci L, Damiano S et al. 2016; Diverse biological effects of the essential oil from Iranian Trachyspermum ammi. Arabian J Chemistry. 9:775-86.

Journal of Developmental Biology
Vol. 12, No. 3, Summer 2020

Comparison of preservative effect of effective material of ecotypes of *Tracheyspermum ammi* on the growth of citrus fungi

Habibi Roodbari A., Larypoor M.*, Sharifnia F.

Department of Biology, Tehran North Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

* Email: frezanejad@gmail.com

Received: November 2019 Accepted: February 2020

Abstract

In this study, we reviewed the comparison the chemical content of active ingredient was isolated from Trachyspermum ammi Plant of three bioclimatic zones of Iran as preserver of Citrous fruits on the growth of *Alternaria alternata, Penicillium digitatum, Aspergillus niger* essential oil of *Trachyspermum ammi* fruit from different ecotypes were prepared by hydrodistillation in a Clevenger-type apparatus and were quantified and identified by comparison with standard spectra after GC-MS analysis. Antifungal effect of essential oils was evaluated by disk diffusion method, Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Fungicidal Concentration (MFC) and 50% inhibition of fungal growth (IC50). All essential oil ecotypes in the disk fusion method had a growth inhibition zone greater than 10 cm but we saw the growth of fungi with extracts and sweets of essential oil. The most effective ecotype of essential oils on the studied fungi were the Shiraz and Kerman ecotype for *Aspergillus niger* with MIC and MFC equal 125 and 250 ug/ml. The lowest percentage of growth inhibition is realated to essential oil of Shiraz for *Alternaria alternata* and Esfahan for *Aspergillus niger* in concentration 31/25 to 2000 ug/ml between (5/58-100%)-(5/3-100%). The finding of this study indicates that essential oil compared to extract and sweat of this plant has a significant antifungal effect on the fungi studied. So you can hope that in the future, replacing herbal essential oil instead of chemical antifungal drugs that always have a lot of side effects can used as citrus retainers.

Keywords: Trachyspermum ammi fruit, Ecotype, Essence, Antifungal, Preservative, *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata*, *Penicillium digitatum*.