مقاله تحقیقی

بررسی فیتوشیمیایی، آنتی‌اکسیدانی و ضد قارچی اسانس برگ گیاه پنج انگشت

فائزه فرخ‌زاده[۱]، حسین دهقان[۲]، سید عبدالله هاشمی[۳] و کمال غلامی‌پور فرد[۴]

۱– دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران.

۲– استادیار مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران.

۳– استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران.

۴– استادیار گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی داراب، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

مسئول مکاتبات: حسین دهقان، ایمیل: h.dehghan@shahed.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۵/۱۷ ۱۰(۲)۶۷–۸۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۱۶

چکیده

گیاه پنج انگشت (*Vitex agnus–castus*)، متعلق به خانواده Lamiaceae، از گیاهان بومی ایران می‌باشد. به منظور یافتن ترکیبات طبیعی دارای خاصیت ضد قارچی و سازگار با محیط زیست، اثر اسانس برگ این گیاه بر رشد میسلیومی سه گونه قارچ مهم عامل تخریب و فساد محصولات کشاورزی شامل *Botrytis cinerea*، *Penicillium digitatum* و *Aspergillus flavus* به روش تماس با بخار به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی در ۶ حجم از اسانس خالص (۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲ و ۶۴ میکرولیتر) با سه تکرار در دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس روی محیط کشت PDA (عصاره سیب زمینی– دکستروز– آگار) در شرایط آزمایشگاه انجام شد. همچنین اثر آنتی‌اکسیدانی اسانس به روش مهار رادیکال آزاد DPPH مورد ارزیابی قرار گرفت. ترکیبات شیمیایی اسانس با استفاده از دستگاه‌های GC و GC–MS شناسایی و اندازه‌گیری شد. بازده استخراج اسانس به روش تقطیر با آب ۰/۴۱ درصد بود. تجزیه شیمیایی اسانس برگ گیاه پنج انگشت نشان داد که سه ترکیب α–pinene (۵۲/۷۰ درصد)، limonene (۱۵/۷۷ درصد) و (E)–caryophyllene (۸/۶۹ درصد) محتوای غالب آن را تشکیل می‌دهند. نتایج آزمون ضد قارچی نشان داد که حجم ۶۴ میکرولیتر دارای بیشترین اثر بازدارندگی بر مهار رشد قارچ است. از بین گونه‌های قارچ مورد مطالعه، *P. digitatum* کمترین و *B. cinerea* بیش‌ترین حساسیت در برابر اسانس را نشان دادند. همچنین، خاصیت بالای آنتی‌اکسیدانی این اسانس با IC_{50} معادل ۰/۰۷ میلی گرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT (IC_{50}= ۰/۰۴ mg/mL) به اثبات رسید.

واژه‌های کلیدی: ویتکس، اسانس، اثر آنتی‌اکسیدانی، ترکیبات شیمیایی، اثر ضدقارچی

مقدمه

قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی به تنهایی باعث کاهش حداقل ۲۰ درصدی عملکرد اکثر محصولات کشاورزی می‌شوند که از میان آنها، قارچ‌های *Botrytis cinerea*، *Penicillium digitatum* و *Aspergillus flavus* از مهمترین و رایج ترین عوامل پوسیدگی پس از برداشت محصولات و فرآورده‌های گیاهی هستند (Rahul *et al.*, 2015). قارچ *B. cinerea* عامل کپک و پوسیدگی خاکستری میوه‌هایی مانند توت فرنگی، کاهو، پیاز، انگور و سیب می باشد، قارچ *P. digitatum* عامل کپک سبز و از مخرب‌ترین و شایع‌ترین عوامل بیماری‌زای پس از برداشت انواع میوه‌ها به‌ویژه مرکبات بوده و *A. flavus* نیز یکی از مخرب‌ترین و خسارت‌زا ترین قارچ‌های بیماری‌زا است که با آلوده کردن

غلات، ذرت، پسته، بادام زمینی و غیره سبب تولید سم افلاتوکسین در آنها می‌شود (Agrios, 2005).

روش‌های متعددی جهت کنترل پوسیدگی‌های قارچی قبل و بعد از برداشت وجود دارد. کاربرد مواد شیمیایی جهت کنترل بیماری‌های پس از برداشت، به دلیل سرطان‌زایی، طولانی بودن زمان تجزیه، ایجاد آلودگی محیط زیست و سایر اثرات نامطلوب آن‌ها بر مواد غذایی و سلامتی انسان محدود شده است. اخیراً جایگزینی قارچ کش‌های صنعتی با ترکیبات طبیعی، به ویژه با منشا گیاهی، به میزان زیادی مورد توجه قرار گرفته است (Matrose *et al*., 2021). استفاده از گیاهان علاوه بر حفظ سلامت، موجب کاهش هزینه‌ها و همچنین کاهش بروز اثرات جانبی ناشی از مصرف ترکیبات شیمیایی می‌شود. استفاده از گیاهان به عنوان آنتی‌اکسیدان نیز در حال افزایش است. ترکیبات فنولی موجود در گیاهان، به دلیل نقش موثر آن‌ها در سرکوب گونه‌های اکسیژن فعال، مهار کردن عناصر موثر در تولید رادیکال‌های آزاد، حذف رادیکال‌های آزاد و افزایش ماندگاری محصولات دارای اهمیت هستند (Katiraee *et al*., 2015). از این رو، در طول سال‌های اخیر مطالعات بسیاری جهت استفاده از گیاهان و ترکیبات گیاهی دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی به عنوان جایگزین ترکیبات شیمیایی صورت گرفته است (Vesaltalab & Gholami, 2012).

اسانس‌ها فرآورده‌هایی از گیاهان هستند که شامل مخلوطی از متابولیت‌های ثانویه و فرّار می‌باشند. مطالعات مختلف اثرات ضد قارچی این ترکیبات را در سطوح مختلف آزمایشگاهی، مزرعه و پس از برداشت اثبات کرده‌اند. برای مثال اثرات ضد قارچی اسانس گیاهانی نظیر میخک، درخت چای، پونه، آویشن و لیمو علیه طیف وسیعی از قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی در مراحل مختلف اسپورزایی، رشد میسلیوم، زئوسپورزایی و نکروز اثبات شده است. اثر ضد قارچی بسیاری از اسانس‌های دیگر حداقل علیه یک سویه بیماری زا بررسی شده است (Whiley *et al*., 2018). در سال‌های اخیر با توجه به حساسیت جوامع کنونی نسبت به باقی مانده سموم در محصولات کشاورزی، قارچ کش‌های مختلفی بر پایه اسانس‌های گیاهی فرموله و معرفی شده‌اند. برای مثال در برخی کشورهای اروپایی، قارچ کش BIOXEDA و Cinnamite™ که بر پایه اسانس میخک تولید شده‌اند، جهت کنترل بیمارهای قارچی بسیاری از میوه‌ها و سبزی‌ها استفاده می‌شوند (Kumar *et al*., 2022). اسانس آویشن نیز به دلیل اثرات ضد قارچی بالای ترکیب تیمول موجود در آن در فرمولاسیون برخی قارچ کش‌ها مانند PathoCURB™ و Guarda®، علیه طیف وسیعی از بیماری‌های قارچی بکار برده می‌شود (Uebbing *et al*., 2023). همچنین برخی پوشش‌های میوه، با اثرات ضد قارچی بالا و بر پایه اسانس‌های گیاهی نظیر اسانس آویشن و زنیان معرفی شده‌اند (Amoozegaran *et al*., 2022).

جنس *Vitex* در نواحی گرمسیری و نیمه‌گرمسیری رشد می‌کند و یکی از منابع طبیعی و مهم غذایی و دارویی در سراسر جهان و همچنین ایران است. گونه‌های *Vitex* به دلیل کاربردهای صنعتی، دارویی و سم شناسی و همچنین محتوای اسانس و فعالیت سمیت گیاهی آن به خوبی شناخته شده هستند (Haghighi & Saharkhiz, 2021). مطالعات نشان داده است که اسانس و عصارهٔ گیاه پنج انگشت دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی و ضد قارچی است (Yilar *et al*., 2016). روغن به دست آمده از بذرهای این گیاه فعالیت ضد قارچی قوی علیه گونه‌های *Candida albicans*، *Candida dubliniensis*، *Candida glabrata* و *Candida krusei* نشان داده است (Asdadi *et al*., 2014). میوه‌ها، گل‌ها و برگ‌های گیاه پنج انگشت حاوی اسیدهای فنولیک و مشتقات آن، فلاونوئیدها، تانن‌ها، ایریدوئیدگلیکوساید و دی‌ترپنوئیدها هستند. عصارهٔ آبی و متانولی آن نیز فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی را نشان داده است. این اثرات احتمالا به علت وجود فلاونوئید casticin موجود در آن‌ها می‌باشد (Svecova *et al*., 2013). عصارهٔ بذر این گیاه علاوه بر خواص دورکنندگی علیه کنه، کک، پشه و مگس (Mehlhoran *et al*., 2005)، فعالیت علف‌کشی نیز دارد (Azizuddin & Chondhury, 2011). در سال‌های اخیر فعالیت ضد قارچی اسانس گیاهان مختلف

از نظر توانایی آن‌ها در مهار جدایه‌های مختلف قارچ مورد بررسی قرار گرفته و نتایج امیدوارکننده‌ای نشان داده است (Hossain *et al*., 2016; Badawy *et al*., 2014 & Vitoratos *et al*., 2013). فعالیت ضد قارچی اسانس گیاه پنج انگشت (*Vitex agnus–castus*) نیز در مطالعات متعددی مورد مطالعه قرار گرفته است (Levchyk *et al*., 2016; Katiraee *et al*., 2015; Ulukanli *et al*., 2015; Stojković *et al*., 2011; Svecova *et al*., 2013)، که این مطالعات از نظر گونه قارچ‌های مطالعه شده، بافت گیاهی مورد استفاده جهت استخراج اسانس و روش انجام مطالعه با مطالعه حاضر متفاوت هستند.

با توجه به اثرات ضد قارچی و آنتی اکسیدانی این گیاه، این پژوهش با هدف معرفی اسانس برگ پنج انگشت به عنوان نگهدارنده محصولات غذایی و کشاورزی، بررسی اثر ضد قارچی آن بر مهار رشد میسلیومی سه گونه قارچ مهم بیمارزای گیاهی شامل *B. cinerea*، *P. digitatum* و *A. flavus* به روش تدخینی (تماس با بخار اسانس) و نیز بررسی ترکیبات شیمیایی و پتانسیل آنتی‌اکسیدانی آن علیه رادیکال آزاد DPPH انجام شده است. امید می‌رود نتایج این پژوهش جهت تولید محلول‌های پاششی ضد قارچ با هدف محافظت از محصولات کشاورزی در مزرعه یا انبار و همچنین بسته بندی‌های ضد قارچ برای محصولات غذایی و کشاورزی مفید باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری گیاه

برگ گیاه پنج انگشت با نام علمی *Vitex agnus*– L. *castus* در شهریور ماه از رویشگاه طبیعی این گیاه در دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی داراب (شهر داراب، استان فارس) جمع‌آوری و پس از انتقال به آزمایشگاه در شرایط سایه همراه با تهویه مناسب، خشک گردید.

تهیه اسانس

برای تهیه اسانس، برگ‌های خشک شدهٔ گیاه به وسیلهٔ آسیاب پودر گردید (مش ۱۰). در هر بار اسانس گیری ۲۰۰ گرم از پودر گیاهی با کمک دستگاه اسانس گیر (کلونجر)، به روش تقطیر با آب به مدت دو ساعت اسانس گیری شد. اسانس‌های جمع‌آوری شده تا زمان استفاده، در ظروف شیشه‌ای تیره رنگ در یخچال نگهداری شدند (Stojkovic *et al*., 2011).

تجزیه و شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس

جهت شناسایی و اندازه‌گیری ترکیبات موجود در اسانس از دو روش کروماتوگرافی گازی (GC) و کروماتوگرافی گازی–طیف سنج جرمی (GC–MS) استفاده شد. از دستگاه کروماتوگرافی گازی–طیف سنج جرمی (Agilent 5975C–MS,7890A–GC) جهت شناسایی ترکیبات موجود در اسانس استفاده شد. برای جداسازی از ستون HP–5MS (30 m × 0.32 mm; 0.25 µm film thickness) و از گاز حامل هلیوم با سرعت یک میلی‌متر بر دقیقه استفاده شد. برنامه دمایی ستون از ۶۰ به ۱۲۰ درجهٔ سلسیوس د با سرعت ۳ درجه سلسیوس در دقیقه، سپس افزایش دما به ۲۴۰ درجه سلسیوس با سرعت ۲۰ درجه سلسیوس در دقیقه و دمای نهایی به مدت ۸/۵ دقیقه حفظ شد. زمان اجرا ۶۰ دقیقه و انرژی یونیزاسیون الکترون در حالت یونیزاسیون الکترون (EI)، ۷۰ الکترون‌ولت بود. دمای منبع یون ۲۳۰ درجه سلسیوس، دمای رابط آشکار-ساز ۲۸۰ درجه سلسیوس ، محدودهٔ جرمی ۴۸۰–۵۰ دالتون، دمای دریچه تزریق ۲۸۰ درجه سلسیوس و نسبت جداسازی ۱:۵۰ بود و از نرم‌افزار Chemstation (D.01.00) استفاده گردید. شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس با مقایسه طیف جرمی این ترکیبات با طیف جرمی ترکیبات استاندارد صورت گرفت (Pouramini *et al*., 2019). از دستگاه کروماتوگرافی گازی Varian CP–3800 با دتکتور FID جهت اندازه گیری درصد ترکیبات موجود در اسانس استفاده شد. برای جداسازی از ستون Hp–5 (30 m × 0.32 mm; 0.25 µm film thickness) و از گاز حامل نیتروژن با سرعت یک میلی‌متر بر دقیقه استفاده شد. برنامه دمایی ستون از ۶۰ به ۲۱۰ درجه سلسیوس با سرعت ۳ درجه سلسیوس در دقیقه و سایر شرایط مشابه به شرایط GC–MS بود (Dehghan *et al*., 2015).

بررسی پتانسیل آنتی‌اکسیدانی اسانس

توانایی اسانس گیاهی در حذف رادیکال‌های آزاد ۲،۲– دی فنیل پیکراهیدرازیل (DPPH) بر اساس روش دهقان و همکاران (Dehghan *et al*., 2016) تعیین شد. بر این اساس مقدار۵۰ میکرولیتر از محلول اسانس (۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در دی متیل سولفواکسید) به ۲۰۰ میکرولیتر از محلول ۱۰۰ میلی‌مولار DPPH (در اتانول) اضافه شد، بعد از ۳۰ دقیقه نگهداری در دمای اتاق و شرایط تاریکی، مقدار کاهش جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد. از بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. در کنترل منفی به جای اسانس از حلال DMSO استفاده شد. آزمون برای هر نمونه حداقل ۳ بار تکرار شد. میزان مهار رادیکال‌های آزاد از طریق معادله ۱ محاسبه شد.

$$\text{درصد مهار} = \frac{\text{جذب نمونه}-\text{جذب کنترل منفی}}{\text{جذب کنترل منفی}} \times ۱۰۰ \quad (۱)$$

جدایه‌های قارچ

جدایه قارچ‌های *B. cinerea*، *Penicillium digitatum* و *Aspergillus flavus* به ترتیب از آزمایشگاه بیماری شناسی گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه شاهد تهران، پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه گرمسیری، واقع در رامسر و پژوهشکده تحقیقات پسته کشور واقع در رفسنجان تهیه شدند. جدایه‌ها داخل تشتک‌های پتری به قطر ۸ سانتی‌متر روی محیط کشت PDA (محیط کشت حاوی عصاره سیب‌زمینی، دکستروز و آگار) در اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی کشت داده شدند تا پس از رشد کامل، برای بررسی اثر بازدارندگی اسانس مورد استفاده قرار گیرند.

بررسی اثر بازدارندگی اسانس بر رشد میسلیومی جدایه‌های قارچ به روش تماس با بخار

اثر بازدارندگی اسانس بر رشد میسلیومی جدایه‌های قارچ بر اساس روش تماس با بخار اسانس و با اندکی تغییر، مورد بررسی قرار گرفت (Amoozegaran *et al*., 2022). دیسک‌هایی به قطر ۵ میلی‌متر از حاشیه پرگنه در حال رشد جدایه‌های کشت شده قارچ با استفاده از چوب پنبه سوراخ کن سترون برداشته و در مرکز پتری‌دیش (قطر ۸ سانتی‌متر) محتوی محیط کشت PDA سترون قرار داده شد. با استفاده از میکروپیپت حجم‌های ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲ و ۶۴ میکرولیتر از اسانس گیاه پنج انگشت بر روی کاغذهای صافی سترون قرار داده شده در درون درب تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت و جدایه قارچ ریخته شد. در تیمار شاهد از تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت و جدایه قارچ با کاغذ صافی بدون اسانس استفاده شد. برای جلوگیری از خروج ترکیبات فرار اسانس، پس از بستن درب پتری‌ها اطراف آن به کمک پارافیلم کاملا مسدود گردید. تیمارها در اتاقک رشد با دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی نگهداری شدند. قطر رشد میسلیوم هر ۲۴ ساعت یکبار به مدت ۴ روز در دو جهت عمود بر هم اندازه‌گیری و میانگین آن به عنوان میزان رشد پرگنه در هر تیمار ثبت گردید. این مطالعه به صورت آزمایش فاکتوریل (فاکتورهای حجم اسانس، جدایه قارچ و زمان) در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد. برای محاسبه درصد مهار رشد میسلیوم جدایه‌های قارچ در تیمارهای مختلف از فرمول شماره ۲ استفاده شد که در آن C قطر رشد میسلیوم جدایه قارچ در پتری شاهد، T قطر رشد میسلیوم جدایه قارچ در تیمار حاوی اسانس و I درصد مهار رشد میسلیوم جدایه قارچ در تیمار مربوطه را نشان می‌دهد.

$$I = [(C–T)/C] \times ۱۰۰ \quad (۲)$$

میزان IC_{50} (حداقل اسانسی که سبب ۵۰ درصد مهاری شود) و MIC (حداقل اسانسی که اثر مهاری نشان دهد) حجم‌های مختلف اسانس علیه هر سه قارچ مورد مطالعه در روز دوم محاسبه گردید. دلیل انتخاب روز دوم، وجود درصدهای مهار کمتر و بیشتر از ۵۰ درصد در حجم‌های مختلف بود که جهت محاسبه IC_{50} ضروری می‌باشد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها نیز با استفاده از نرم‌افزار SAS و در صورت معنی‌دار بودن اختلاف‌ها، مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون T–test (LSD) در سطح ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

بررسی فیتوشیمیایی اسانس برگ پنج انگشت

بازده استخراج اسانس برگ گیاه پنج انگشت ۰/۴۱ درصد بود. بر اساس نتایج آزمون GC–MS، ۴۳ ترکیب در اسانس مذکور شناسایی شد (جدول ۱). براساس نتایج کروماتوگرافی گازی عمده محتوای اسانس شامل سه ترکیب α–pinene (۵۲/۷۰ درصد)، limonene (۱۵/۷۷ درصد) و (E)–caryophyllene (۸/۶۹ درصد) بود (جدول ۱). بیشترین مادۀ موثرۀ اسانس گیاه پنج انگشت ترکیب α–pinene با مقدار (۵۲/۷۰ درصد) بود.

جدول ۱– ترکیبات موجود در اسانس برگ پنج انگشت

Table 1. The compounds in leaf essential oil of *V. agnus–castus*

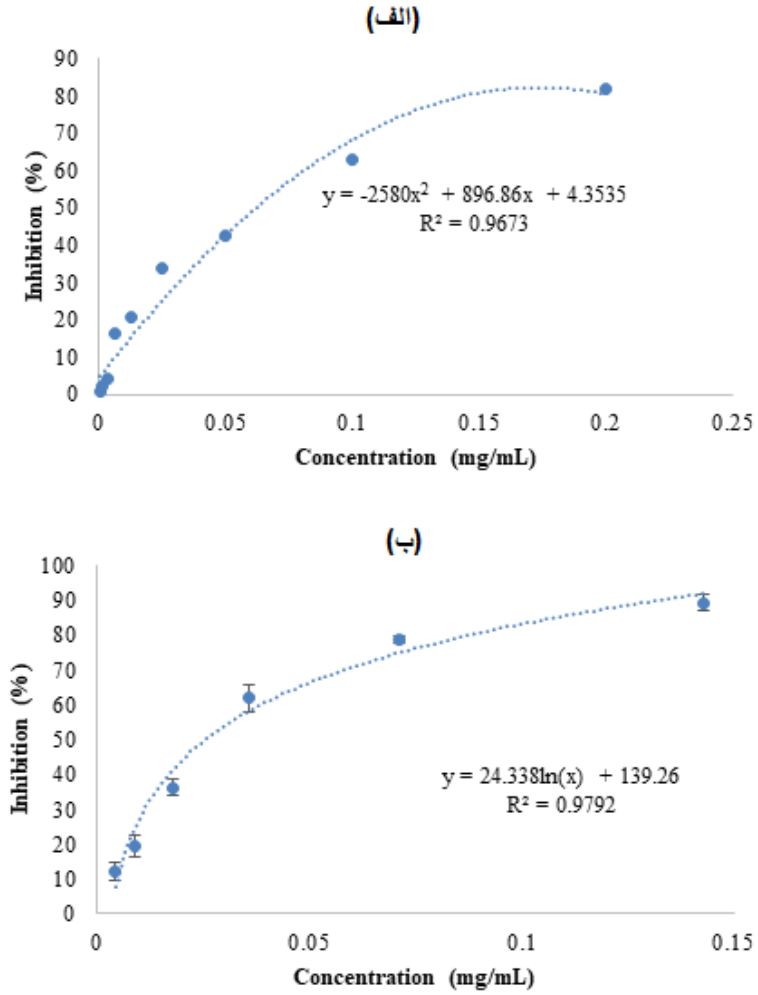
	Compound	RI*	Percentage (%)
1	α–Thujene	926	0.09
2	α–Pinene	934	52.70
3	Camphene	952	0.14
4	Sabinene	974	3.09
5	β–Pinene	977	0.84
6	Myrcene	990	2.34
7	α–Phellandrene	1008	1.12
8	α–Terpinene	1016	0.02
9	p–Cymene	1024	0.53
10	Limonene	1029	15.77
11	1,8–Cineole	1032	0.04
12	(Z)–β–Ocimene	1038	0.28
13	(E)–β–Ocimene	1049	0.28
14	γ–Terpinene	1061	0.14
15	Terpinolene	1089	0.42
16	Linalool	1099	0.58
17	cis–Verbenol	1145	0.09
18	p–Cymen–8–ol	1184	0.27
19	α–Terpineol	1190	0.08
20	Citronellol	1228	0.11
21	Borny acetate	1287	0.19
22	Methyl geranate	1325	0.15
23	δ–Elemene	1339	0.58
24	α–Terpinyl acetate	1349	0.87
25	Citronellyl acetate	1356	0.83
26	Neryl acetate	1363	0.31
27	β –Bourbonene	1387	0.08
28	□–Gurjunene	1410	0.37
29	(E)–Caryophyllene	1422	8.69
30	trans–□–Bergamotene	1437	0.39
31	(Z)– β –Farnesene	1443	1.17
32	(E)– β –Farnesene	1459	0.46
33	allo–Aromadendrene	1461	0.67
34	Germacrene D	1486	0.20
35	β–Selinene	1492	0.27
36	Bicyclogermacrene	1497	3.45
37	β–Bisabolene	1509	0.12
38	β–Sesquiphellandrene	1524	0.30
39	Germacrene B	1558	0.09
40	Caryophyllene oxide	1585	0.36
41	Viridiflorol	1591	0.31
42	α–Cadinol	1654	0.59
43	α–Bisabolol	1685	0.10
	Total		99.51

* RI: Retention Index

در مطالعات صورت گرفته شده در نقاط مختلف جهان ترکیبات مختلفی به‌عنوان ترکیبات عمده اسانس گیاه پنج انگشت (گونه *Vitex agnus–castus*) گزارش شده است ولی در بیشتر آنها α–pinene به‌عنوان یکی از چند ترکیب عمده اسانس این گیاه گزارش شده است. کتیرایی و همکاران (Katiraee *et al*., 2015) نیز با آنالیز فیتوشیمیایی اسانس این گیاه نشان دادند که بیشترین ترکیب در اسانس برگ گیاه پنج انگشت (جمع آوری شده از منطقه مراغه استان آذربایجان شرقی) ترکیب α–pinene به میزان ۱۹/۴۸درصد بود. در پژوهشی دیگر یولوکانلی و همکاران (Ulukanli *et al*.,2015)، با آنالیز اسانس برگ گیاه پنج انگشت جمع آوری شده از منطقه زورکان (جنوب ترکیه) نشان دادند که 1,8–cineole با ۲۴/۳۸ درصد عمده‌ترین ترکیب و پس از آن sabinene با ۲۲/۷۷ درصد، trans–β–farnesene با ۸/۵۰ درصد، α–pinene با ۷/۱۴ درصد، β–caryophyllene و 1–terpinen–4–ol به ترتیب با ۶/۴۹ و ۵/۲۳ درصد در جایگاه‌های بعدی قرارداشتند. هباب و همکاران (Habbab *et al*., 2016) نیز با مطالعهٔ ترکیبات موجود در اسانس برگ گیاه پنج انگشت (جمع آوری شده از غرب الجزایر) نشان دادند که اصلی‌ترین ترکیب شناسایی شده در آن 1,8–cineole با ۱۸/۲۷ درصد و بعد از آن caryophyllene با ۸/۶۰ درصد و (+)–epi–bicyclosesquiphell– andrene با ۶/۰۰ درصد بودند. استوجکویچ و همکاران (Stojkovic *et al*.,2011)، ترکیبات اصلی اسانس این گیاه را که از جنوب مونتنگرو (شمال دریای مدیترانه) جمع آوری شده بود را 1,8–cineole با ۲۲ درصد، trans– β–farnesene با ۹/۴ درصد، α–pinene با ۹/۴ و trans– β caryophyllene ۸/۲ درصد گزارش کردند. همچنین، در پژوهشی دیگر، اصلی‌ترین ترکیبات اسانس برگ پنج انگشت مصری، trans–caryophyllene با ۱۵/۱۹، 1,8–cineole ۱۳/۰۴ درصد، bicyclogermacrene ۷/۳۰ درصد گزارش شد (Badawy & Abdelgaleil, 2014). همانطور که مشخص است، تفاوت‌های قابل توجهی در نوع و میزان ترکیبات اسانس برگ گیاه پنج انگشت مناطق مختلف وجود دارد. تفاوت در شرایط اقلیمی و نوع خاک محل رشد گیاه و زمان برداشت، از مهمترین دلایلی هستند که سبب تفاوت در ترکیب و درصد متابولیت‌های ثانویه از جمله ترکیبات اسانس در مطالعات مختلف می‌شوند (Zhelev *et al*., 2022). به همین دلیل توصیه شده است که در مطالعاتی که به بررسی اثرات بیولوژیک فرآورده‌های گیاهی پرداخته می‌شود، ترکیبات فیتوشیمیایی آن‌ها نیز مورد مطالعه قرار گیرد. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که اسانس برگ پنج انگشت منطقه داراب استان فارس دارای بیشترین میزان ترکیب α–pinene (با مقدار ۵۲/۷۰ درصد) در میان سایر مناطق می‌باشد.

بررسی پتانسیل آنتی‌اکسیدانی اسانس

اثر آنتی‌اکسیدانی غلظت‌های مختلف اسانس پنج انگشت از طریق اندازه‌گیری قدرت کاهش ظرفیت رادیکالی DPPH مورد ارزیابی قرار گرفت. بر این اساس قدرت مهار غلظت‌های ۰/۰۰۰۴ الی ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از اسانس بر حسب درصد مهار رادیکال آزاد بدست آمد. شکل ۱ (الف) درصد مهار رادیکال DPPH را در برابر غلظت اسانس نشان می‌دهد.



شکل ۱– منحنی درصد مهار رادیکال DPPH در غلظت‌های مختلف اسانس برگ پنج انگشت (الف) و BHT (ب)

Fig.1. The inhibition activity of various concentrations of (a) *V. agnus–castus* leaf essential oil and (b) BHT, against DPPH

با بدست آمدن معادله منحنی، مقدار IC_{50} (غلظتی که سبب مهار ۵۰ ٪رادیکال‌های آزاد می‌شود) اسانس گیاه پنج انگشت ۰/۰۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد. همچنین، جهت مقایسه، از ترکیب استاندارد هیدروکسی تولوئن بوتیله (BHT) که یک آنتی‌اکسیدان رایج است استفاده شد و درصد مهار رادیکال آزاد از BHT در غلظت‌های ۰/۰۰۴ الی ۰/۱۴۳ به دست آمد (شکل ۱ ب). با به دست آمدن معادله این منحنی، مقدار IC_{50} برای BHT معادل ۰/۰۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. نتایج نشان داد که قدرت آنتی‌اکسیدانی اسانس گیاه پنج انگشت وابسته به غلظت می‌باشد و با وجود اینکه میزان IC_{50} آن بیشتر از BHT است، اما در مقایسه با بسیاری از ترکیبات طبیعی اثر آنتی‌اکسیدانی بالایی را از خود نشان می‌دهد.

نتایج بررسی پتانسیل آنتی‌اکسیدانی نشان داد که اسانس برگ خشک گیاه پنج انگشت با مقدار IC_{50} برابر با ۰/۰۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر آنتی‌اکسیدانی قابل‌توجهی دارد. کتیرایی و همکاران (Katiraee *et al.*,2015) نیز در مطالعه خود گزارش کردند که اسانس برگ خشک این گیاه با میزان IC_{50} برابر با ۲۷/۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر خاصیت آنتی‌اکسیدانی قابل ملاحظه‌ای دارد. گوکبولوت و همکاران (Gokbulut *et al.*,2010) در پژوهش خود عصاره متانولی برگ و میوه خشک گیاه پنج انگشت را بررسی و گزارش

کردند که هر دو عصاره فعالیت مهار رادیکال آزاد قابل توجهی دارند. میزانIC_{50} آن‌ها به ترتیب برابر با ۰/۰۰۱±۰/۴۴۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و ۰/۰۰۴±۰/۶۱۲ میلی گرم بر میلی‌لیتر علیه رادیکال DPPH تعیین شد. همچنین مالتاس و همکاران (Maltas *et al*.,2010) خواص آنتی اکسیدانی عصاره متانولی برگ خشک گیاه پنج انگشت را به روش‌های مختلف از جمله احیای آهن، حذف هیدروژن پروکساید و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کاهشی مس، مورد بررسی قرار دادند و بیشترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به میزان ۰/۸ ±۹۳/۵ درصد در روش حذف هیدروژن پروکساید تعیین شد. در مطالعه Asdadi *et al*. (2015) فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس بذر گیاه پنج انگشت را مورد بررسی قرار دارند، نتایج نشان داد که اسانس بذر این گیاه خاصیت آنتی‌اکسیدانی ضعیفی علیه رادیکال DPPH دارد و میزان IC_{50} آن در مهار دو رادیکال DPPH و BHT را به ترتیب برابر با ۱/۰۷۲ و ۰/۵۸۴۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند. Rahmati –Joneidabad & Alizadeh Behbahani (2021) نیز با مطالعه اثر آنتی‌اکسیدانی پنج انگشت گزارش کردند که اسانس اندام هوایی این گیاه به طور موثری سبب مهار رادیکال های آزادDPPH و ABTS شد و میزان IC_{50} آن در مهار دو رادیکال آزاد نامبرده به ترتیب ۴۸/۶۲ و ۴۰/۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. ساریکورک سو و همکاران (Sarikurkcu *et al*.,2009) نیز در پژوهش خود، فعالیت آنتی اکسیدانی میوه‌ی گیاه پنج انگشت را به روش‌های مختلف از جمله DPPH بررسی کردند و نشان دادند که غلظت ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اسانس میوه گیاه پنج انگشت دارای ۰/۵۱ درصد اثر آنتی‌اکسیدانی است که در مقایسه با استانداردهای BHT (برابر با ۹۲/۶۸ درصد) و BHA (برابر با ۹۶/۲۷ درصد) پتانسیل آنتی‌اکسیدانی بسیار ضعیفی دارد.

اثر بازدارندگی اسانس بر رشد میسیلیومی جدایه‌های قارچ

نتایج تجزیه واریانس اثر حجم‌های مختلف اسانس گیاه پنج انگشت روی سه گونه قارچ بیماری‌زای گیاهی در دوره زمانی چهار روز نشان داد که بین اثر سطوح مختلف فاکتورهای جدایه قارچ، حجم اسانس و زمان و نیز برهم‌کنش تیمارهای قارچ، حجم اسانس و زمان در مهار رشد میسیلیوم قارچ، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد وجود دارد (جدول ۲).

جدول ۲– تجزیه واریانس اثر حجم‌های مختلف اسانس برگ پنج انگشت روی سه گونه قارچ بیماری‌زای گیاهی در دوره زمانی چهار روز

Table 2. Variance analysis of the effect of various volumes of *V. agnus–castus* leaf essential oil on three species of plant pathogenic fungi during four days

	DF	MS	F	Pr > F
Fungi isolate	2	23811.70	187.63*	<0.0001
Essential oil volume	5	13780.54	108.58*	<0.0001
Essential oil Fungi isolate ×	10	2938.58	23.15*	<0.0001
Time	3	9289.48	73.20*	<0.0001
Time × Fungi isolate	6	352.19	2.78*	0.0139
Essential oil Time ×	15	368.25	2.90*	0.0005
Fungi isolate × Essential oi Time ×	30	455.20	3.59*	<0.0001
Error	144	126.91		

* Significant difference at the probability level of 5%

به طور کلی جدایه‌های قارچ مورد مطالعه، حساسیت یکسانی در برابر اسانس پنج انگشت نداشته و با هم اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد نشان دادند. در بین سه گونه قارچ مورد مطالعه، *P. digitatum* کمترین و *B. cinerea* بیشترین میزان مهار رشد میسلیوم را نشان دادند. افزایش حجم اسانس سبب افزایش درصد مهار رشد میسلیوم جدایه‌های قارچ شد. براساس این نتایج اسانس گیاه پنج انگشت در حجم ۶۴ میکرولیتر بیشترین و در حجم ۲ میکرولیتر کمترین میزان مهار رشد میسلیوم قارچ را داشته است. سطوح مختلف فاکتور روز نیز از نظر آماری اختلاف معنی‌داری را نشان دادند. میزان مهار از روز اول تا چهارم روند نزولی داشت به گونه ای که در روز اول بیشترین میزان و در روز چهارم کمترین میزان مهار رشد میسلیوم جدایه‌های قارچ مشاهده شد. اثر حجم‌های ۸، ۱۶، ۳۲ و ۶۴ میکرولیتر اسانس گیاه پنج انگشت اختلاف معنی‌داری را در روز اول روی میزان مهار رشد میسلیوم جدایه *B. cinerea* نشان ندارد. ولی با گذشت زمان پس از چهار روز بین اثر حجم‌های ۱۶، ۳۲ و ۶۴ میکرولیتر اسانس تفاوت معنی‌داری مشاهده شد. در دو جدایه دیگر تفاوت معنی‌داری بین اثر حجم‌های مختلف اسانس پس از چهار روز مشاهده نشد (جدول ۳). با گذشت زمان، درصد مهار رشد میسلیوم هر سه جدایه قارچ در همه حجم‌های استفاده شده، به‌جز حجم ۶۴ میکرولیتر در جدایه *B. cinerea*، و حجم ۲ میکرولیتر در جدایه *P. digitatum*، روند کاهشی را نشان دادند. به گونه‌ای که بیشترین میزان مهار در روز اول و کمترین میزان در روز چهارم مشاهده شد (جدول ۳). با توجه به مشاهده مهار ۱۰۰ درصدی حجم ۶۴ میکرولیتر اسانس علیه *B. cinerea* در همه روزها، جهت بررسی اثر قارچ کشی آن، درب پلیت حاوی اسانس با یک درب دیگر تعویض شد و نمونه‌ها مجدداً به انکوباتور منتقل شدند. پس از ۳ روز قارچ *B. cinerea* شروع به رشد کرد. لذا این امر نشان داد که اسانس گیاه پنج انگشت در این حجم صرفاً اثر مهاری دارد و اثر قارچ کشی مشاهده نشد.

جهت مقایسه بهتر، میزان IC_{50} (حداقل اسانسی که سبب ۵۰ درصد مهاری شود) و MIC (حداقل اسانسی که اثر مهاری نشان دهد) حجم‌های مختلف اسانس برگ پنج انگشت علیه هر سه قارچ مورد مطالعه در روز دوم محاسبه گردید (جدول ۴). دلیل انتخاب روز دوم، وجود درصدهای مهار کمتر و بیشتر از ۵۰ درصد در حجم‌های مختلف بود که جهت محاسبه IC_{50} ضروری می‌باشد.

همانطور که در جدول ۴ مشخص است، با وجود اینکه میزان MIC اسانس برگ پنج انگشت علیه *B. cinerea* بیشتر از دو سویه دیگر است، اما میزان IC_{50} آن بسیار کمتر و معادل ۲/۹۸ µL است. لذا مشخص است که سویه *B. cinerea* نسبت به حجم‌های بالاتر از ۴ µL از اسانس برگ پنج انگشت حساسیت بیشتری دارد و اثر مهاری اسانس با افزایش حجم آن با شیب بیشتری افزایش می‌یابد.

Katiraee *et al.* (2015) با بررسی اثر ضد قارچی اسانس برگ خشک گیاه پنج انگشت بر تعدادی از قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی به روش میکرودایلوشن، گزارش کردند که از بین جدایه‌های بررسی شده، گونه‌های *Aspergillus flavus* با MFC برابر ۲۵ میکرولیتر بر میلی‌لیتر و گونه های *Penicillium* sp. و *A. niger* با MFC برابر ۵۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر کمترین تاثیر را نشان دادند. همچنین Stojkovic *et al.* (2011)، با بررسی اثر مهار اسپورزایی اسانس برگ گیاه خشک پنج انگشت به روش میکرودایلوشن و با مقایسه MIC و MFC اسانس برگ گیاه پنج انگشت با قارچ کش بیفونازول گزارش کردند که اثر ضد قارچی اسانس گیاه پنج انگشت روی *A. flavus* بالا، و روی *P. ochrochloron* و *P. funiculosum* بسیار بالا بود.

همچنین Stojkovic *et al.* (2011)، با بررسی اثر مهار اسپورزایی اسانس برگ گیاه خشک پنج انگشت به روش میکرودایلوشن و با مقایسه MIC و MFC اسانس برگ گیاه پنج انگشت با قارچ کش بیفونازول گزارش کردند که اثر ضد قارچی اسانس گیاه پنج انگشت روی *A. flavus* بالا، و روی *P. ochrochloron* و *P. funiculosum* بسیار بالا بود.

جدول ۳– درصد بازدارندگی (انحراف معیار±میانگین) اسانس برگ گیاه پنج انگشت بر رشد میسلیوم سه جدایه قارچ بیماری‌زای گیاهی در حجم‌های مختلف و دوره زمانی چهار روز

Table 3. Inhibition percentage (standard deviation ± mean) of the *V. agnus–castus* leaf essential oil on the mycelium growth of three isolates of plant pathogenic fungi in various volumes during four days

	Day	Essential oil volume (µL)					
		2	4	8	16	32	64
B. cinerea	1	28.54±8.40$^{h–p}$	72.73±3.94$^{c–f}$	86.74±7.81$^{a–d}$	94.44±4.81^{ab}	100±0.0^{a}	100±0.0^{a}
	2	NI^{w}	19.72±5.28$^{l–t}$	59.11±5.03$^{e–g}$	76.16±6.43$^{c–e}$	98.77±2.14^{a}	100±0.0^{a}
	3	NI^{w}	9.97±2.00$^{r–w}$	45.45±0.96^{gh}	57.26±8.43^{fg}	90.48±8.43$^{a–c}$	100±0.0^{a}
	4	NI^{w}	9.70±2.43$^{r–w}$	13.59±3.56$^{o–w}$	25.98±8.73$^{j–q}$	75.49±5.31$^{c–e}$	100±0.0^{a}
P. digitatum	1	NI^{w}	15.00±3.00$^{n–w}$	43.33±5.77 $^{g–j}$	36.67±5.77$^{g–j}$	45±5.19^{gh}	80.0±5.0$^{b–d}$
	2	3.92±1.59$^{t–w}$	10.05±3.11$^{q–w}$	16.30±4.52$^{m–u}$	22.30±4.17$^{k–r}$	26.72±6.11$^{i–q}$	58.95±5.78$^{e–g}$
	3	4.76±1.31$^{s–w}$	6.92±2.17$^{r–w}$	16.09±1.96$^{n–v}$	16.11±4.43$^{n–v}$	14.86±4.01$^{n–v}$	32.17±3.93$^{h–n}$
	4	8.66±2.02$^{q–w}$	6.95±2.78$^{q–w}$	11.67±2.91$^{n–w}$	14.39±4.12$^{n–v}$	15.96±2.64$^{n–v}$	8.71±0.38$^{q–w}$
A. flavus	1	11.11±2.36$^{p–w}$	38.89±3.97$^{h–k}$	58.33±3.67$^{e–g}$	44.44±5.85$^{g–i}$	44.44±5.10$^{g–i}$	72.22±4.81$^{d–e}$
	2	15.50±2.40$^{n–w}$	20.63±4.56$^{l–t}$	45.68±5.19^{gh}	34.41±5.28$^{h–m}$	30.18±4.03^{h}	44.80±3.47^{hg}
	3	13.46±4.28$^{o–w}$	23.62±4.26$^{k–r}$	37.46±6.20$^{h–l}$	30.02±7.05$^{h–o}$	25.98±5.57$^{j–q}$	30.99±1.92$^{h–o}$
	4	11.51±2.88$^{p–w}$	19.33±2.17$^{l–t}$	30.74±6.50$^{h–o}$	23.48±5.85$^{k–r}$	19.99±4.30$^{k–t}$	20.77±0.27$^{k–t}$

NI: No Inhibition, the same or letters are not significantly different at the 5% level of the LSD test

جدول ۴– میزان IC_{50} و MIC اسانس برگ گیاه پنج انگشت علیه رشد میسلیوم قارچ‌ها در روز دوم

Table 4. The IC_{50} and MIC values of *V. agnus–castus* leaf essential oil against the fungi in the second day

	IC_{50} (µL)	MIC (µL)
B. cinerea	2.98	4
P. digitatum	54.12	2
A. flavus	55.29	1

Habbab *et al.* (2016) در مطالعه خود اثر ضد قارچی اسانس برگ خشک گیاه پنج انگشت به روش مخلوط کردن اسانس با محیط کشت را بررسی کردند و نشان دادند که درصد مهار اسانس گیاه پنج انگشت روی قارچ‌های *Aspergillus flavus* (۲۰/۸۳ درصد) *A. ochraceus* (۵۰ درصد) و *Penicillium escpansum* (۵۵/۲۶ درصد) بود. همچنین در پژوهشی Alizadeh Behbahani & Rahmati–Joneidabad (2021)، اثر ضد قارچی اسانس گیاه پنج انگشت علیه گونه‌های *Penicillium digitatum* و *P. italicum* به روش انتشار از دیسک محتوی اسانس در آگار و انتشار از چاهک در آگار را بررسی و گزارش کردند که قطر هاله عدم رشد برای دو گونه قارچ نامبرده در روش انتشار از دیسک محتوی اسانس در آگار به ترتیب ۱۲/۷ و ۱۱/۶ میلی‌متر و در روش انتشار از چاهک در آگار به ترتیب ۱۴/۵ و ۱۳/۴ بود.

Abdelgaleil & Badawy (2014)، نیز با مطالعه اثر ضد قارچی اسانس برگ خشک پنج انگشت بر رشد میسلیوم قارچ *Botrytis cinerea*، میزان EC_{50} اسانس نامبرده را (۵۹۲–۳۷۳) ۴۶۲ میلی‌گرم بر لیتر گزارش کردند. پیش از این، خاصیت ضدمیکروبی مونوترپن‌هایی نظیر α–pinene، linalool، 1,8–cineole، limonene و camphor شناسایی شده است (Xia *et al*., 1999; Badawy & Abdelgaleil, 2014). از آنجایی که اسانس‌ها معمولا سرشار از ترکیبات ترپنوئیدی و به‌خصوص مونوترپن‌ها می‌باشند، به احتمال زیاد، اثر ضد قارچی اسانس‌ها در فرآیند مهار رشد میسلیوم قارچ‌ها به دلیل حضور همین مونوترپن‌ها می‌باشد. این ترکیبات می‌توانند با افزایش

پراکسیداز لیپیدی مثل رادیکال‌های هیدروکسیل، آلوکسیل و آلکوپروکسیل سبب مرگ سلولی شوند. اسانس‌ها روی میسیلیوم تاثیر گذاشته و با تحریک خروج اجزا از سیتوپلاسم، کاهش استحکام و یکپارچگی دیواره سلولی هیف منجر به فروپاشی و مرگ میسیلیوم می‌شوند. هرچند اسانس‌های گیاهی فعالیت ضدمیکروبی خوبی از خود نشان داده‌اند، اما دلیل این اثرات به خوبی مستند نشده است. فعالیت ضدمیکروبی اسانس به وسیله‌ی اجزای اصلی آن یا به علت اثر هم‌افزایی بین ترکیبات اصلی و جزئی آن می‌تواند تحریک شود. با این حال تحقیقات زیادی وجود دارد که سعی در توضیح مکانیسم ضد میکروبی دارند. این مکانیسم های ضدمیکروبی شامل حمله به غشای سلولی دو لایه فسفولیپیدی، قطع شدن سیستم‌های آنزیمی، تخریب مواد ژنتیکی باکتری– قارچ، تشکیل اسید چرب هیدروپراکسیداز توسط اکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع، انعقاد سیتوپلاسم، آسیب به لیپیدها و پروتئین‌ها، تغییر نیروی محرکه پروتون، جریان الکترون و یا انتقال فعال آن‌ها، همچنین می‌توانند فعالیت آنزیم‌های محافظ و به طور متوالی یک یا تعداد بیشتری از مسیرهای بیوشیمیایی را مهار کنند. از آنجایی که اسانس‌ها آبگریز هستند، می‌توانند به غشای سلولی دو لایه فسفولیپیدی وارد شوند و با ناهموار کردن ساختار میتوکندری، نشت سلولی را افزایش دهند. ورود اسانس‌ها به غشای سلولی سبب افزایش نفوذ پذیری غشاء و نشت سلولی می‌شود. نشت اجزای حیاتی داخل سلولی بر تنفس سلولی و دیگر سیستم‌های آنزیمی نیز تاثیر می‌گذارد (Badawy & Abdelgaleil, 2014).

نتیجه‌گیری

عمده ترکیبات تشکیل دهنده اسانس برگ گیاه پنج انگشت مورد مطالعه در این پژوهش را سه ترکیب α– pinene (۵۲/۷۰ درصد)، limonene (۱۵/۷۷ درصد) و (E)–caryophyllene (۸/۶۹ درصد) تشکیل داده بودند. با توجه به این نتایج و بررسی نتایج سایر مطالعات صورت گرفته، می‌توان گفت که اسانس برگ پنج انگشت منطقه داراب استان فارس دارای بیشترین میزان ترکیب α–pinene (با مقدار ۵۲/۷۰ درصد) در میان سایر مناطق می‌باشد. همچنین نتایج نشان داد که قدرت آنتی‌اکسیدانی اسانس گیاه پنج انگشت وابسته به غلظت می‌باشد و با وجود اینکه میزان IC_{50} آن (۰/۰۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بیشتر از BHT (۰/۰۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) است، اما در مقایسه با بسیاری از ترکیبات طبیعی اثر آنتی‌اکسیدانی بالایی را از خود نشان می‌دهد. اثرات ضد قارچی این اسانس، بخصوص علیه سویه *B. cinerea*، نشان از پتانسیل بالای این فرآورده طبیعی جهت حفاظت از محصولات و فرآورده‌های گیاهی، بخصوص میوه‌ها و سبزیجات دارد.

با توجه به نتایج این پژوهش و نیز سایر مطالعات انجام شده توسط دیگر پژوهشگران به نظر می‌رسد که این اسانس گزینه مناسبی جهت استفاده در بسته بندی میوه‌ها، سبزیجات تازه و برخی محصولات غذایی باشد. جهت ماندگاری و اثر طولانی‌تر اسانس‌ها می‌توان از آن‌ها در بسته بندی‌های بدون منفذ و یا پوشش‌های میوه و سبزیجات استفاده کرد. مطالعه و تحقیق بر روی سایر فرآورده‌های این گیاه، نظیر اسانس سایر اندام‌ها و عصاره‌های آن و همچنین بررسی ایمنی و سمیت آن‌ها به منظور دسترسی به ترکیبات قارچ کش طبیعی جهت کنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی یا به عنوان مدلی جهت ساخت ترکیبات قارچ کش جدید ضروری به نظر می‌رسد.

سپاسگزاری

از جناب آقای دکتر حسین امین (ریاست محترم دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی داراب، دانشگاه شیراز) و جناب آقای مهندس عبدالله ستوده (کارشناس آزمایشگاه تکنولوژی بذر و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی داراب، دانشگاه شیراز) بابت حمایت‌ها و همکاری‌های بی دریغ‌شان و همچنین جناب آقای دکتر امیر محمد ناجی (استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه شاهد) بابت کمک در تجزیه و تحلیل آماری و تفسیر نتایج این پژوهش، صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

References

Agrios, G.N. 2005. Plant Pathology. 5th ed. Academic Press, Elsevier, USA.

Amoozegaran, A., Dehghan, H., Homami, S.S. & Hashemi, S.A. 2022. Efficacy of an edible coating, containing thyme essential oil, to control *Fusarium oxysporum* and the quality of tomato fruits. Journal of Food Measurement and Characterization, 16(5): 3760–3767.

Asdadi, A., Hamdouch, A., Oukacha, A., Moutaj, R., Gharby, S., Harhar, H., El Hadek, M., Chebli, B. & Hassani, L.I. 2015. Study on chemical analysis, antioxidant and in vitro antifungal activities of essential oil from wild *Vitex agnus–castus* L. seeds growing in area of argan tree of Morocco against clinical strains of Candida responsible for nosocomial infections. Journal De Mycologie Medicale, 25(4): 118–127.

Asdadi, A., Idrissi Hassani, L. M., Chebli, B., Moutaj, R., Gharby, S., Harhar, H., Salghi, R. & El Hadek, M. 2014. Chemical composition and antifungal activity of *Vitex agnus–castus* L. seeds oil growing in Morocco. Journal of Materials and Environmental Science, 5(3): 823–830.

Azizuddin, C. M. 2011. Antibacterial, phytotoxic, insecticidal and cytotoxic potential of Vitex agnus–castus. Journal of Medicinal Plants Research, 5(23): 5642–5645.

Badawy, M.E. & Abdelgaleil, S.A. 2014. Composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Egyptian plants against plant pathogenic bacteria and fungi. Industrial Crops and products, 52: 776–782.

Dehghan, H., Sarrafi, Y. & Salehi, P. 2016. Antioxidant and antidiabetic activities of 11 herbal plants from Hyrcania region, Iran. Journal of food and drug analysis, 24(1): 179–188.

Dehghan, H., Sarrafi, Y. & Salehi., P. 2015. Chemical composition of the essential oil of *Convolvulus persicus* L. Journal of Essential Oil–Bearing Plants, 18(3): 592–595.

Gokbulut, A., Ozhan, O., Karacaoglu, M. & Sarer E. 2010. Radical scavenging activity and vitexin content of *Vitex agnus castus* leaves and fruits FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences, 12(35): 85–91.

Habbab, A., Sekkoum, K., Belboukhari, N., Cheriti, A.Y. & Aboul–Enein H. 2016. Essential oil chemical composition of *Vitex agnus–castus* L. from Southern–West Algeria and its antimicrobial activity. Current Bioactive Compounds, 12(1): 51–60

Haghighi, T.M. & Saharkhiz, M. J. 2021. Phytotoxic potential of *Vitex pseudo–negundo* leaf and flower extracts and analysis of phenolic compounds. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 34: 102018.

Hossain, F., Follett, P., Vu, K.D., Harich, M., Salmieri, S. & Lacroix, M. 2016. Evidence for synergistic activity of plant–derived essential oils against fungal pathogens of food. Food microbiology, *53*: 24–30.

Katiraee, F., Mahmoudi, R, Tahapour, K., Hamidian, G. & Emami, S.J. 2015. Biological properties of *Vitex agnus–castus* essential oil (phytochemical component, antioxidant and antifungal activity). Biotechnology and Health Sciences, 2(2): e26797.

Kumar, S., Mahapatro, G. K., Yadav, D. K., Tripathi, K., Koli, P., Kaushik, P., Sharma, K. & Nebapure, S. 2022. Essential oils as green pesticides: An overview. Indian J. Agric. Sci, 92(11), 1298–1305.

Levchyk, N.Y, Skrypchenko, N.V, Liybinska, A.V., Yunosheva, O.P, Dziuba, O.I. & Rakhmetov D.B. 2016. Anti–Fungal Activity and Allelopathic Influence of *Vitex agnus–castus* L. (Verbenaceae) Essential Oils on *Actinidia deliciosa* in vitro Culture. Ecologia Balkanica, 8(2): 17–24.

Maltas, E., Uysal, A., Yildiz, S. & Durak, Y. 2010. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of *Vitex agnus–castus* L. Fresenius Environmental Bulletin, 19(12): 3094–3099.

Matrose, N.A., Obikeze, K., Belay, Z.A. & Caleb, O.J., 2021. Plant extracts and other natural compounds as alternatives for post–harvest management of fruit fungal pathogens: A review. Food Bioscience, 41, 100840.

Mehlhorn, H., Schmahl, G. & Schmidt, J. 2005. Extract of the seeds of the plant *Vitex agnus castus* proven to be highly efficacious as a repellent against ticks, fleas, mosquitoes and biting flies. Parasitology Research, 95(5): 363–365.

Pouramini, P., Fotokian, M.H., Dehghan, H. & Hensel, G. 2019. Effect of *Thiobacillus* and superabsorbent on essential oil components in Thyme species. Journal of Essential Oil–Bearing Plants, 22(3): 799–810.

Rahmati Joneidabad, M. & Alizadeh Behbahani, B. 2021. Evaluation of chemical activity and antifungal effect of *Vitex agnus–castus* essential oil on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* causing orange rot. Journal of Food Science and Technology, 18(114): 82–73.

Rahul, S.N., Khilari, K., Sagar, S., Chaudhary, S., Kumar, S., Vihan, N. & Tomar, A., 2015. Challenges in postharvest management of fungal diseases in fruits and vegetables–a review. South Asian Journal of Food Technology and Environment, 1(2): 126–130.

Sarikurkcu, C., Arisoy, K., Tepe, B., Cakir, A., Abali, G. & Mete, E. 2009. Studies on the antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of *Vitex agnus castus* L. fruits from Turkey. Food and Chemical Toxicology, 47(10): 2479–2483.

Stojkovic, D., Sokovic, M., Glamoclija, J., Dzamic, A., Ciric, A., Ristic, M. & Grubisic, D. 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of *Vitex agnus–castus* L. fruits and leaves essential oils. Food Chemistry, 128(4): 1017–1022.

Svecova, E., Proietti, S., Caruso, C., Colla, G. & Crino, P. 2013. Antifungal activity of *Vitex agnus–castus* extract against *Pythium ultimum* in tomato. Crop Protection, 43: 223–230.

Uebbing, M. R., Hayden, Z.D. & Hausbeck, M. 2023. Conventional and Biopesticide Fungicides for Cucurbit Downy Mildew Control on Cucumber in Michigan. Plant Health Progress, 1.

Ulukanli, Z., Cenet, M., Ozturk, B., Bozok, F., Karaborklu, S. & Demirci, S.C. 2015. Chemical characterization, phytotoxic, antimicrobial and insecticidal activities of *Vitex agnus–castus*' essential oil from East Mediterranean region. Journal of Essential Oil–Bearing Plants, 18(6): 1500–1507.

Vitoratos, A., Bilalis, D., Karkanis, A. & Efthimiadou, A. 2013. Antifungal activity of plant essential oils against *Botrytis cinerea*, *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj–Napoca, 41(1): 86–92.

Whiley, H., Gaskin, S., Schroder, T. & Ross, K. 2018. Antifungal properties of essential oils for improvement of indoor air quality: A review. Reviews on environmental health, 33(1): 63–76.

Xia, Z., Mao, X. & Luo, Y. 1999. Study on antifungal mechanism of alpha–pinene. Bulletin of Hunan Medical University, 24(6): 507–509.

Yilar, M., Bayan, Y. & Onaran, A. 2016. Chemical composition and antifungal effects of *Vitex agnus–castus* L. and *Myrtus communis* L. plants. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj–Napoca, 44(2): 466–471.

Zhelev, I., Petkova, Z., Kostova, I., Damyanova, S., Stoyanova, A., Dimitrova–Dyulgerova, I., Antova, G., Ercisli, S., Assouguem, A, Kara, M. & Almeer, R. 2022. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil of Fruits from *Vitex agnus–castus* L., Growing in Two Regions in Bulgaria. Plants, 11(7): 896.

Phytochemical, Antioxidant and Antifungal Investigations of Vitex agnus–castus Leaf Essential Oil

Faezeh Farokhzad [1], Hossein Dehghan[2], Seyed Abdollah Hashemi [3], Kamal Gholamipour Fard[4]

1.M.S, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Shahed University, Tehran, Iran.
2.Assistant Professor, Medicinal Plants Research Center, Shahed University, Tehran, Iran.
3.Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahed University, Tehran, Iran.
4. Assistant Professor, Department of Plant Production, College of Agriculture and Natural Resources of Darab, Shiraz University, Darab, Shiraz, Iran.

Corresponding author: Hossein Dehghan, email: h.dehghan@shahed.ac.ir

Received: Aug., 08, 2023 10(2) 67–80 Accepted: Oct., 08, 2023

Abstract

Vitex agnus–castus, belonging to the Lamiaceae family, is used in traditional medicine in Iran. With the aim of finding natural compounds with anti–fungal and eco–friendly properties, the effect of Vitex agnus–castus essential oil on mycelial growth of three plant pathogenic fungi was evaluated. The study was conducted as factorial experiments with three fungal isolates, including *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum* and *Aspergillus flavus*. The inhibitory activity of six doses of the essential oil (2, 4, 8, 16, 32 and 64 µl) with three replicates were examined. Also, the antioxidant effect of the oil was evaluated by DPPH free radical inhibition method. The chemical compounds of the oil were identified and quantified using GC–MS method. Analysis of the chemical composition of the essential oil showed that α–pinene (52.70%), limonene (15.77%) and (E)–caryophyllene (8.69%) constitute the most components of the essential oil, respectively. As results of the study showed that the 64 ml of *V. agnus–castus* essential oil has the greatest inhibitory effect on mycelial growth of studied fungi. Among the studied fungal species, *P. digitatum* showed the least and *B. cinerea* showed the most sensitivity to the of *V. agnus–castus* essential oil. Also, the essential oil was showed a high antioxidant activity with IC_{50} value of 0.07 mg/ml compared to the BHT (IC_{50} = 0.04 mg/mL), as a synthetic antioxidant.

Keywords: Vitex agnus–castus, *essential oil, antioxidant activity, chemical compounds, antifungal activity*