

## بررسی اثر ضدقارچی گیاه نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.) بر قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی

مجتبی عبدالملکی<sup>۱\*</sup>، صحبت بهرامی‌نژاد<sup>۲</sup>، محمد سالاری<sup>۳</sup>، سعید عباسی<sup>۴</sup>، ناصر پنجه‌که<sup>۳</sup>

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه

۲- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه

۳- استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل

۴- استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه

\*آدرس مکاتبه: کرمانشاه، دانشگاه رازی، دانشکده کشاورزی، گروه گیاه‌پزشکی کدپستی: ۸۵۴۳۸-۶۷۱۵۶

تلفن: ۰۸۳۷۲۲۴۱۴۴، همراه: ۰۹۱۸۳۳۷۵۱۹۵

پست الکترونیک: mojtabaabdolmalki@gmail.com

تاریخ تصویب: ۸۹/۳/۲۲

تاریخ دریافت: ۸۷/۵/۱۶

### چکیده

مقدمه: استفاده از عصاره‌های گیاهی به دلیل داشتن خواص دارویی، ضدقارچی، ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی متابولیت‌های ثانویه در کنترل عوامل میکروبی رو به پیشرفت است.

هدف: بررسی فعالیت ضدقارچی و یافتن حلال مناسب در استخراج متابولیت‌های موثر گیاه نعناع فلفلی به منظور کنترل قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی.

روش بررسی: اندام‌های هوایی گیاه نعناع فلفلی<sup>۱</sup> پس از جمع‌آوری خشک شده و عصاره آن با استفاده از حلال‌های آب، متانول، اتانول، استون و کلروفرم استخراج شد. تأثیر عصاره‌ها بر روی چهار گونه قارچ بیماری‌زای گیاهی، شامل *Rhizoctonia solani*، *Fusarium oxysporum*، *Phytophthora drechleri* و *Bipolaris sorokiniana* به دو روش دیسک کاغذی و اختلاط با محیط کشت مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: نتایج مطالعه برای دستیابی به بهترین حلال برای استخراج مواد بازدارنده رشد قارچ نشان داد که آب بهترین حلال برای استخراج مواد بازدارنده از نعناع فلفلی است. عصاره استخراج شده با حلال متانول و استون تأثیر کمی بر رشد میسلیمی قارچ *B. sorokiniana* داشتند و عصاره اتانولی و کلروفرمی به کلی فاقد اثر قارچ‌ایستایی *Fungistatic* بودند. در بررسی شیب غلظت عصاره، *B. sorokiniana* و *F. oxysporum* در غلظت دو میلی‌گرم بر دیسک کاغذی، تحت تأثیر قرار گرفتند؛ حال آنکه رشد میسلیمی دو قارچ دیگر در غلظت چهار میلی‌گرم بر دیسک کاغذی، تحت تأثیر قرار گرفت. در روش اختلاط با محیط کشت، عصاره آبی در غلظت ۵۰۰ پی‌پی‌ام به طور کامل از رشد *P. drechleri* و در غلظت ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام از رشد *B. sorokiniana* جلوگیری کرد. حال آن که در مورد دو قارچ دیگر حتی در غلظت ۲۰۰۰ پی‌پی‌ام نیز رشد به طور کامل متوقف نشد.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق بیانگر قابلیت گیاه نعناع فلفلی در کنترل قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی می‌باشد. همچنین می‌توان گفت که آب بهترین حلال برای استخراج مواد ضدقارچی از این گیاه می‌باشد.

کل واژگان: نعناع فلفلی، قارچ ایستایی، دیسک کاغذی، اختلاط با محیط کشت

<sup>۱</sup> *M. piperita*



## مقدمه

در سال‌های اخیر به دلیل بروز برخی مشکلات و تهدیدهای ناشی از مصرف سموم شیمیایی در سیستم‌های کشاورزی، گرایش زیادی به استفاده از پتانسیل بالقوه مواد بیولوژیکی در کنترل آفات، بیماری‌ها و علف‌های هرز ایجاد شده است [۱۰، ۳۲]. در این بین، استفاده از ترکیب‌های طبیعی گیاهان برای رسیدن به منظور فوق مورد توجه پژوهشگران زیادی قرار گرفته است. محققین زیادی در سال‌های اخیر به مطالعه اثرات ضدباکتریایی، ضدقارچی و حشره‌کشی اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی پرداخته‌اند [۳۳، ۲۸]. فعالیت ضد میکروبی و حشره‌کشی اسانس و عصاره چندین گونه گیاه به خوبی شناخته شده و مورد استفاده قرار گرفته‌اند [۳۲]. تقریباً ۲۰ درصد از گیاهان شناخته شده در جهان در آزمون‌های زیستی مورد بررسی قرار گرفته‌اند [۳۸]. این روش مطالعه در مورد ترکیبات طبیعی که ممکن است منجر به کشف عوامل موثر در کنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی (باکتری‌ها و قارچ‌ها) شود، از اهمیت بسیار برخوردار است.

نعناع فلفلی با نام علمی *Mentha pipertia* L. از خانواده Lamiales از جمله گیاهان دارویی و معطری است که اسانس آن مصارف دارویی، غذایی، آرایشی و بهداشتی فراوانی دارد. این گونه، هیبریدی است که از تلاقی بین گونه‌های *Mentha aquatica* و *Mentha spicata* به دست آمده است [۱۴، ۳۱]. ترکیبات موجود در این گیاه دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی، قارچ‌کشی و حشره‌کشی می‌باشند [۷، ۱۸، ۲۹، ۴۱]. خاصیت ضد میکروبی آن علیه *Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus* و *Candida albicans* تأیید شده است [۲، ۴۱]. اثر عصاره این گیاه روی تشکیل مایه قارچ‌های اندوفیت برگی مورد بررسی قرار گرفته و تأثیر بازدارندگی آن به اثبات رسیده است [۲۶]. همچنین ثابت شده که اسانس روغنی نعناع باعث از بین رفتن گونه‌ای از سالمونلا شده [۳۹] و روی *Candida albicans* دارای بازدارندگی می‌باشد [۱۳]. در کروماتوگرافی، وجود دی اتیل اتر و استیک اسید در عصاره گیاه به اثبات رسیده که میزان این ترکیبات به محیط رویش گیاه بستگی دارد [۲۲]. همچنین وجود شش ماده

شیمیایی ایزومنتول، پلی‌گون، نئومنتول، منتول، پیریتون و نئوایزومنتول در روغن گیاه مشخص شده است [۲۱، ۳۵، ۳۶]. منوترین‌ها و سزکویی‌ترین‌ها نیز در گیاه نعناع فلفلی سنتز می‌شود [۲۳]. ترکیبات منتول، اتیل استات و نئومنتول در اندام‌های مسن گیاه بیشتر وجود دارد در حالی که منتول و ایزومنتول در اندام‌های جوان یافت می‌شوند. همچنین در مقایسه با برگ‌ها، گل‌ها حاوی مقادیر بیشتری از متوفورین هستند [۱۹]. وجود فلاونوئیدها نیز در برگ گزارش شده است [۱۷]. فلاونوئیدها گروهی از متابولیت‌های ثانویه هستند که در بسیاری از فعالیت‌های بیولوژیکی گیاه شامل فعالیت‌های دفاعی گیاه دخالت دارند [۴، ۵]. شش فلاونوئید شامل اریوسیتین، ناریروتین، هیسپریدین، لوتیولین ۷-او - روتینوساید، ایزورویفولین، دیوسمین و همچنین رزماریک اسید در جنس *M. pipertia* وجود دارد [۴۰]. وجود ترکیب متوفورولاکتون نیز در اندام‌های هوایی نعناع فلفلی گزارش شده است [۱۵]. اسانس این گیاه حداقل ۵ درصد استر و حداقل ۵۰ درصد منتول به حالت استری یا آزاد، ۵ - ۳ درصد منتون و مقدار کمی سینئول و دیگر ترین‌ها را دارا می‌باشد [۲۰].

قارچ *Bipolaris* که تلئومورف آن *Cochliobolus* می‌باشد عامل پوسیدگی معمولی ریشه، لکه قهوه‌ای برگ، سوختگی خوشه و سیاه شدن دانه‌های گندم و جو می‌باشد. این قارچ در مناطق گرم و مرطوب از تهدیدات جدی گندم و جو است [۱۱]. *Fusarium oxysporum* یکی از مهم‌ترین گونه‌های فوزاریوم است که فرم جنسی تولید نمی‌کند. در گیاهان مولد پژمردگی آوندی<sup>۱</sup> هست و مرگ ناگهانی ایجاد می‌نماید. پوسیدگی طوقه و ریشه نیز در اثر این قارچ گزارش شده است [۳۵]. *R. solani* یکی از مهم‌ترین قارچ‌های بیماری‌زای خاکزی است که توانایی و قدرت حمله‌ی خیلی زیاد به گیاهان میزبان را دارد و این قارچ باعث پوسیدگی دانه، مرگ گیاهچه، شانکرهای ساقه، پوسیدگی ریشه، پوسیدگی میوه و بیماری‌های شاخه و برگ می‌شود و *Phytophthora* نیز یکی از پارازیت اختیاری گیاهان است که حداقل ۱۶ گونه

<sup>1</sup> Vascular wilt



آن، در گیاهان بیماریزا بوده و غالباً موجب پوسیدگی ریشه می‌شوند [۱۱].

این مطالعه، با هدف بررسی وجود یا عدم وجود فعالیت ضدقارچی عصاره نعنای فلفلی بر چهار گونه قارچ بیماریزای گیاهی (*R. solani*) از بازیدیومیست‌ها، *P. drechsleri* از شبه قارچ‌های اتومیست و *B. sorokiniana* و *F. oxysporum* از آسکومیست‌ها، دست‌یابی به مناسب‌ترین حلال برای استخراج عصاره حاوی متابولیت‌های فعال و موثر در بازدارندگی رشد میسیلیوم قارچ‌های مورد بررسی و تعیین حداقل غلظت موثر MIC در مورد هر عصاره انجام شده است.

## مواد و روش‌ها

### جدایه‌های قارچی

در این مطالعه از یک جدایه *P. drechsleri* (جدا شده از ریشه چغندر قند)، یک جدایه *F. oxysporum* (جدا شده از ریشه نخود)، یک جدایه *R. solani* (جدا شده از غده چغندر قند) یک جدایه *B. sorokiniana* (جدا شده از ریشه گندم) که قبلاً بیماریزایی آن‌ها روی میزبان مربوطه اثبات شده بود، استفاده شد.

### آماده‌سازی بافت گیاهی

گیاه نعنای فلفلی در مرحله گلدهی از مزرعه گیاهان دارویی در شهرستان کنگاور در استان کرمانشاه جمع‌آوری و پس از شستشو و خشک کردن به وسیله آسیاب خرد شد به طوری که از الک ۱ مش عبور کند.

### عصاره‌گیری با استفاده از حلال‌های مختلف

**عصاره‌گیری با آب:** در این روش مقدار پنج گرم از اندام هوایی آسیاب شده با ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل مخلوط و در بن ماری جوش قرار داده شد. سپس با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف شده و به منظور تبخیر آب و استحصال عصاره در آن در دمای ۵۵/۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد [۳].

**عصاره‌گیری با متانول:** در این روش مقدار پنج گرم از بافت آسیاب شده در ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد روی شیکر قرار داده شد. پس از این مدت ۷۵ میلی‌لیتر از محلول را برداشته، ۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به آن اضافه شد که حجم آن به ۱۰۰ میلی‌لیتر برسد، سپس هم حجم با آن هگزان اضافه شد. این مخلوط دو ساعت روی شیکر قرارداده شد، سپس بخش‌های مختلف جدا گردید و بخش متانولی جهت تبخیر متانول و استحصال عصاره در زیر هود قرار داده شد [۴،۵].

**عصاره‌گیری با اتانول:** استخراج با اتانول مطابق روش قبلی انجام گرفت، با این تفاوت که در این مورد از هگزان استفاده نشد.

**عصاره‌گیری با کلروفرم:** مقدار پنج گرم از پودر خشک گیاه در ۱۰۰ میلی‌لیتر کلروفرم به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد روی شیکر قرار داده شد. پس از این مدت بخش کلروفرمی جدا شد، سپس جهت تبخیر کلروفرم و استحصال عصاره در زیر هود قرار داده شد. عصاره در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد [۳۷].

**عصاره‌گیری با استون:** مراحل استخراج با استون مطابق با روش استخراج با کلروفرم انجام گرفت.

### ارزیابی اثر بازدارندگی عصاره بر اساس روش دیسک کاغذی

در روش دیسک کاغذی<sup>۱</sup> مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم از هر عصاره در یک میلی‌لیتر از همان حلال حل شد [۲۴]، در مورد عصاره استخراج شده با استون به علت قابل حل بودن این عصاره در آب از حلال آب استفاده و در مورد عصاره آبی، متانولی، اتانولی و کلروفرمی به ترتیب از حلال‌های آب، متانول ۴۵ درصد، اتانول ۴۵ درصد و کلروفرم استفاده شد. سپس مقدار ۵۰ میکرولیتر از هر نمونه معادل ۵ میلی‌گرم (طی پنج مرحله، هر بار ۱۰ میکرولیتر) با استفاده از سمپلر روی دیسک‌های کاغذ صافی به قطر شش میلی‌متر بارگذاری شده و

<sup>۱</sup> paper disc



قرار داده شد تا حلال در زیر لامینار فلو تبخیر شود. مقدار صفر به عنوان شاهد در نظر گرفته شده، که در این مورد صرفاً از حلال مورد استفاده برای استخراج عصاره استفاده شد. دیسک‌هایی از قارچ‌ها به قطر شش میلی‌متر توسط چوب پنبه سوراخ کن از کشت‌های یک هفته‌ای قارچ تهیه و در وسط پتری حاوی محیط PDA قرار داده شد. در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور، قطر کلنی ریزوکتونیا بعد از ۳۲ ساعت و سه قارچ دیگر بعد از ۷۲ ساعت در حدود سه سانتی‌متر رسید، سپس دیسک‌های حاوی عصاره، در مورد قارچ ریزوکتونیا در فاصله یک و نیم سانتی‌متری و سه قارچ دیگر در فاصله یک سانتی‌متری از حاشیه کلنی قرار داده شده و در فواصل زمانی مختلف شعاع هاله بازدارندگی از روبرو، سمت چپ و راست دیسک کاغذی یادداشت‌برداری شد. این آزمایش در چهار تکرار انجام شد و نتایج به دست آمده نیز با تکرار مجدد کل آزمایش ثبت شد. به منظور بررسی اثر قارچ‌کشی یا قارچ‌ایستایی عصاره‌ها، دیسک قارچی تیمارهایی که رشد قارچ در آنها مشاهده نشد روی محیط PDA واکشت شد و رشد یا عدم رشد قارچ روی محیط کشت جدید بررسی شد [۱۶].

## نتایج

### عصاره‌گیری

مقدار عصاره استخراج شده از اندام‌های هوایی گیاه نعناع فلفلی در حلال‌های آب، متانول، اتانول، استون و کلروفرم به ترتیب ۱۹، ۱۲، ۱۶ و ۱۵ درصد وزنی / وزنی پودر خشک گیاه بود.

### اثر بازدارندگی عصاره بر اساس روش دیسک کاغذی

نتایج بررسی اثر بازدارندگی عصاره بر اساس روش دیسک کاغذی در جدول شماره ۱ ارائه شده است. چنان‌که ملاحظه می‌شود، عصاره استخراج شده با استفاده از حلال آب مقطر استریل بیشترین تأثیر بازدارندگی را بر قارچ‌های بیماریزای مورد بررسی نشان داده است.

مطابق جدول شماره ۱ شعاع هاله بازدارندگی عصاره آبی نعناع فلفلی در غلظت پنج میلی‌گرم بر دیسک کاغذی روی *F. oxysporum* و *B. sorokiniana* به ترتیب در حدود ۱۲

اجازه داده شد تا حلال در زیر لامینار فلو تبخیر شود. مقدار صفر به عنوان شاهد در نظر گرفته شده، که در این مورد صرفاً از حلال مورد استفاده برای استخراج عصاره استفاده شد. دیسک‌هایی از قارچ‌ها به قطر شش میلی‌متر توسط چوب پنبه سوراخ کن از کشت‌های یک هفته‌ای قارچ تهیه و در وسط پتری حاوی محیط PDA قرار داده شد. در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور، قطر کلنی ریزوکتونیا بعد از ۳۲ ساعت و سه قارچ دیگر بعد از ۷۲ ساعت در حدود سه سانتی‌متر رسید، سپس دیسک‌های حاوی عصاره، در مورد قارچ ریزوکتونیا در فاصله یک و نیم سانتی‌متری و سه قارچ دیگر در فاصله یک سانتی‌متری از حاشیه کلنی قرار داده شده و در فواصل زمانی مختلف شعاع هاله بازدارندگی از روبرو، سمت چپ و راست دیسک کاغذی یادداشت‌برداری شد. این آزمایش در چهار تکرار انجام شد و نتایج به دست آمده نیز با تکرار مجدد کل آزمایش ثبت شد.

در مرحله بعد، به منظور تعیین اثر غلظت عصاره بر میزان بازدارندگی آن، اثر ضدقارچی مقادیر ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میکرولیتر (به ترتیب معادل ۱، ۲، ۳ و ۴ میلی‌گرم بر دیسک کاغذی) از عصاره‌ای که در آزمایش مقدماتی مؤثر شناخته شد (عصاره آبی)، در مقایسه با شاهد، مطابق روش فوق، مورد بررسی قرار گرفت.

### ارزیابی اثر بازدارندگی از طریق اختلاط عصاره با محیط کشت

در روش اختلاط با محیط کشت پس از انجام آزمایش‌های مقدماتی غلظت‌های ۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ پی. پی. ام. انتخاب شد. به این منظور، مقادیر عصاره‌ی لازم برای هر کدام از غلظت‌های مذکور در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت محاسبه و در یک و نیم میلی‌لیتر حلال حل شد. همچنین مقدار یک و نیم میلی‌لیتر از حلال مورد استفاده برای بررسی اثر احتمالی آن بر میزان رشد قارچ به عنوان شاهد در آزمایش منظور شد. محیط کشت پایه پس از تهیه، در دستگاه اتوکلاو به مدت ۲۰ دقیقه تحت فشار یک اتمسفر و در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد ضدعفونی شد. سپس ظرف حاوی محیط کشت در دمای اتاق



(جدول شماره ۲).

### تعیین اثر بازدارندگی عصاره بر اساس روش اختلاط عصاره با محیط کشت

در بررسی اثر بازدارندگی عصاره بر اساس روش اختلاط عصاره با محیط کشت، عصاره آبی در غلظت ۵۰۰ پی پی ام از رشد *P. drechsleri* و در غلظت ۱۰۰۰ پی پی ام از رشد *B. sorokiniana* به طور کامل جلوگیری نمود؛ حال آن که دو قارچ دیگر حتی در غلظت ۲۰۰۰ پی پی ام نیز رشد به طور کامل متوقف نشد (جدول شماره ۳).

و ۹ میلی متر بوده است. عصاره‌های استخراج شده با حلال متانول و استون صرفاً تأثیر کمی بر رشد میسلیومی قارچ *B. sorokiniana* داشتند، این در حالی بود که عصاره اتانولی و کلروفرمی فاقد اثر قارچ ایستایی Fungistatic بود.

نتایج بررسی اثر غلظت‌های مختلف عصاره بر رشد میسلیومی قارچ‌ها بر اساس روش دیسک کاغذی در جدول شماره ۲ ارائه شده است. مطابق این جدول عصاره آبی نعناع فلفلی در این روش در غلظت دو میلی گرم بر میلی لیتر روی دو قارچ *F. oxysporum* و *B. sorokiniana* اثر بازدارندگی نشان داد؛ حال آن که رشد میسلیومی دو قارچ دیگر در غلظت چهار میلی گرم بر دیسک کاغذی، تحت تأثیر قرار گرفت

جدول شماره ۱- شعاع بازدارندگی عصاره نعناع فلفلی (*Mentha piperita*) استخراج شده با حلال‌های مختلف در غلظت پنج میلی گرم بر دیسک کاغذی روی قارچ‌های مورد مطالعه در روش دیسک کاغذی

| گیاه                   | حلال    | قارچ              |                     |                      |                       |
|------------------------|---------|-------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|
|                        |         | <i>R. solani</i>  | <i>F. oxysporum</i> | <i>P. drechsleri</i> | <i>B. sorokiniana</i> |
| <i>Mentha piperita</i> | آب      | * $6/58 \pm 0/22$ | $12/25 \pm 0/48$    | $7/75 \pm 0/32$      | $9/13 \pm 0/24$       |
|                        | متانول  | NE                | NE                  | NE                   | $5/75 \pm 0/14$       |
|                        | اتانول  | NE                | NE                  | NE                   | NE                    |
|                        | استون   | NE                | NE                  | NE                   | $4/05 \pm 0/21$       |
|                        | کلروفرم | NE                | NE                  | NE                   | NE                    |

\*: میانگین شعاع بازدارندگی بر حسب میلی متر  $\pm$  خطای معیار، NE: فاقد تاثیر

جدول شماره ۲- شعاع بازدارندگی عصاره آبی نعناع فلفلی در غلظت‌های ۱ تا ۴ میلی گرم بر دیسک کاغذی روی رشد قارچ‌های مورد مطالعه

| غلظت بر حسب میلی گرم بر دیسک کاغذی | قارچ             |                     |                      |                       |
|------------------------------------|------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|
|                                    | <i>R. solani</i> | <i>F. oxysporum</i> | <i>P. drechsleri</i> | <i>B. sorokiniana</i> |
| ۰                                  | NE               | NE                  | NE                   | NE                    |
| ۱                                  | NE               | NE                  | NE                   | NE                    |
| ۲                                  | NE               | * $4/63 \pm 0/24$   | NE                   | $4/53 \pm 0/21$       |
| ۳                                  | NE               | $8/58 \pm 0/22$     | NE                   | $5/38 \pm 0/24$       |
| ۴                                  | $5/30 \pm 0/34$  | $9/65 \pm 0/32$     | $6/03 \pm 0/37$      | $6/38 \pm 0/24$       |

جدول شماره ۳- قطر کلنی قارچ‌های *Bipolaris sorokiniana* و *Phytophthora drechsleri* *Fusarium oxysporum* *Rhizoctonia solani* هفته پس از کشت در محیط‌های حاوی غلظت‌های مختلف عصاره آبی نعناع فلفلی (*Mentha piperita*) در روش اختلاط با محیط کشت

| غلظت بر حسب ppm | قارچ              |                     |                      |                       |
|-----------------|-------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|
|                 | <i>R. solani</i>  | <i>F. oxysporum</i> | <i>P. drechsleri</i> | <i>B. sorokiniana</i> |
| ۰               | * $9/00 \pm 0/00$ | $66/60 \pm 0/23$    | $75/51 \pm 0/64$     | $76/31 \pm 0/48$      |
| ۵۰۰             | $69/0 \pm 1/40$   | $29/19 \pm 0/86$    | $6/00 \pm 0/00$      | $21/00 \pm 0/59$      |
| ۱۰۰۰            | $21/25 \pm 0/85$  | $29/25 \pm 1/1$     | $6/00 \pm 0/00$      | $6/00 \pm 0/00$       |
| ۱۵۰۰            | $20/75 \pm 0/85$  | $23/25 \pm 0/63$    | $6/00 \pm 0/00$      | $6/00 \pm 0/00$       |
| ۲۰۰۰            | $21/50 \pm 1/04$  | $20/25 \pm 0/75$    | $6/00 \pm 0/00$      | $6/00 \pm 0/00$       |

\*: میانگین قطر کلنی بر حسب میلی متر  $\pm$  خطای معیار



## بحث

*Aspergillus niger* و *Candida albicans* و همچنین باکتری‌های مختلف بیماریزای انسانی در تحقیقی در ترکیه به اثبات رسیده است [۱۲]. این در حالی است که داورت و همکاران نشان دادند که عصاره اتانولی گیاه نعناع فلفلی اثر بازدارنده‌ای بر روی قارچ *Candida albicans* ندارد.

اثر بازدارنده عصاره علاوه بر نوع حلال مورد استفاده برای استخراج به غلظت عصاره و نوع قارچ مورد بررسی نیز بستگی دارد. در این مطالعه از دو روش متفاوت به منظور سنجش اثر ضدقارچی عصاره استفاده شد. برخلاف انتظار، نتایج حاصل از ارزیابی اثر ضدقارچی در این دو روش تا حدی تفاوت داشت. به طوری که قارچ *P. drechsleri* که در روش دیسک کاغذی آستانه تأثیرپذیری آن چهار میلی‌گرم بر دیسک کاغذی بوده و در غلظت‌های پایین‌تر از این واکنشی نشان نداده است، در روش اختلاط عصاره با محیط کشت، در مقایسه با سایر قارچ‌های مورد بررسی، در کمترین غلظت به کار رفته (۵۰۰ پی.پی.ام.) کاملاً از رشد بازمانده است. با توجه به این که در روش دیسک کاغذی، ماده مؤثره به تدریج در محیط کشت انتشار یافته و حاشیه کلنی در حال رشد را تحت تأثیر قرار می‌دهد، لذا، قارچ مورد بررسی فرصت لازم برای بهره‌گیری از واکنش‌های دفاعی خود را داشته و می‌تواند از طریق سازوکاری مناسب با سمیت ماده مؤثره مقابله نماید. حال آنکه در روش اختلاط عصاره با محیط کشت، ماده مؤثره در جای جای محیط کشت حضور داشته و از طرفی پیکره‌ی قارچ مورد بررسی نیز به دلیل آن که در همان زمان واکنش شده و قبلاً در این محیط رشد نداشته است، در حدی نیست که به خوبی بتواند از قابلیت‌های دفاعی خود استفاده نماید. بدیهی است که با توجه به تنوع قارچ‌های مورد مطالعه، ماهیت سازوکارهای دفاعی آن‌ها نیز متفاوت بوده و در نتیجه می‌توان انتظار داشت که آستانه تأثیرپذیری هر قارچ نسبت به مواد ضدقارچی و شیب تغییرات رشد نسبت به مقدار ماده مؤثره متفاوت باشد.

با توجه به این که شرایط جغرافیایی بر مقدار و حتی نوع متابولیت‌ها مؤثر است [۲۲]، استخراج عصاره گیاهان در مناطق مختلف رشد آنها می‌تواند نتایج متفاوتی داشته باشد. کمیت و

این مطالعه نشان داد که عصاره آبی نعناع فلفلی قادر است رشد میسیلیومی قارچ‌های مهم بیماریزای گیاهی را در شرایط آزمایشگاهی کنترل نماید. خاصیت ضد میکروبی اسانس و عصاره نعناع فلفلی در مطالعات متعدد به اثبات رسیده است. موریرا و همکاران (۲۰۰۵) نشان دادند که اسانس این گیاه دارای خاصیت ضدباکتریایی است. در مطالعه‌ای دیگر نشان داده شده است که اسانس این گیاه قادر به توقف رشد *P. infestans* عامل بیماری بادزدگی سیب زمینی در شرایط آزمایشگاهی است و در آزمایش گلخانه‌ای موجب کاهش شدت بیماری سیب‌زمینی شده است [۳۴]. خاصیت ضدقارچی اسانس نعناع فلفلی علیه قارچ *F. oxysporum* نیز به اثبات رسیده است [۳۰].

از آنجایی که تقریباً اغلب ترکیبات گیاهی که دارای خواص ضد میکروبی می‌باشند، ترکیبات آلی اشباع شده یا ترکیبات آروماتیک هستند، غالباً از حلال‌های اتانولی یا متانولی برای استخراج اولیه آنها استفاده می‌شود؛ در واقع در بسیاری از مطالعات، از کاربرد آب به منظور جداسازی ترکیبات مؤثر گیاهی اجتناب می‌شود. با این حال، ترکیبات محلول در آب مثل پلی ساکاریدها و پلی پپتیدها همچون فاباتین و انواع لکتین‌ها، هرچند دارای خواص دفاعی هستند با روش‌های معمول قابل استخراج نمی‌باشند. در مواردی، تانن‌ها و ترپنوئیدها را نیز می‌توان در فاز آبی پیدا کرد اما در این مورد نیز اغلب از حلال‌هایی با قطبیت کمتر استفاده می‌شود [۸]. استفاده از حلال‌های متفاوت برای استخراج در این آزمایش نشان داد که متابولیت‌های دارای خاصیت ضدقارچی با استفاده از حلال خاص قابل جدا سازی هستند. چنانکه نتایج این مطالعه نشان داد نوع حلال در استخراج مواد بازدارنده اهمیت بسیاری داشته و در این مورد، آب در بین حلال‌های مورد استفاده برای استخراج متابولیت‌های ضدقارچی از اندام‌های در حال رشد نعناع فلفلی، مناسب‌ترین حلال تشخیص داده شد؛ لذا می‌توان استنباط کرد که اغلب ترکیبات مؤثر ضدقارچی در گیاه نعناع فلفلی ترکیبات قطبی هستند. با وجود این، قابلیت بازدارندگی عصاره اتانولی بذر این گیاه علیه قارچ‌های



می‌باشند [۴۵]. می‌توان این ترکیبات را به تنهایی و یا در تعامل با یکدیگر به عنوان عامل موثر در خاصیت ضدقارچی این گیاه مورد بررسی قرار داد. تشخیص دقیق ساختار شیمیایی و میزان بازدارندگی متابولیت‌های استخراج شده در تحقیق حاضر در دست بررسی می‌باشد.

## تشکر و قدردانی

بدینوسیله از همکاری و مساعدت‌های بی‌شائبه جناب آقای دکتر عباس علی زمانی عضو محترم هیأت علمی گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی کرمانشاه تقدیر و تشکر می‌شود.

کیفیت مقدار اسانس و مقدار ماده منتول در نمونه‌های مختلف در اقلیم‌های مختلف متفاوت می‌باشد [۴۲]. لذا پیشنهاد می‌گردد که گیاه مذکور از رویشگاه‌های مختلف با شرایط اقلیمی متفاوت جمع‌آوری شده و تاثیر شرایط آب و هوایی بر میزان ترکیبات بازدارنده مورد بررسی قرار گیرد.

نعناع فلفلی دارای ۱/۲ تا ۱/۵ درصد روغن‌های فرار است که ۳۰ تا ۷۰ درصد آن را منتول و استرهای منتول تشکیل می‌دهد [۱]. با توجه به این موضوع که ترکیب منتول بیشترین میزان متابولیت ثانویه موجود در اسانس این گیاه می‌باشد و همچنین با در نظر گرفتن اینکه ترکیبات فلاونوئیدی به میزان ۱۲ درصد در اسانس این گیاه وجود دارد و بر با در نظر گرفتن این که ترکیبات فلاونوئیدی دارای فعالیت ضد میکروبی

## منابع

1. Anonymous. Peppermint. In: Dombek C, ed. Lawrence Review of Natural Products. *St. Louis: Facts and Comparison*. 1990.
2. Aridogan BC, Mumcu E, Ozbasar D, Demirci M, Kaya S and Baydar H. 2002. Antimicrobial activity and chemical composition of some essential oils. *Arch Pharm. Res.* 25 (6): 860 - 4.
3. Azimi AA, Delnavaz HB and Mansour GA. Antifungal effect of aqueous alcoholic and phenolic extracts of seed and leaves of *Sorghum bicolor* against *Fusarium solani* *Fusarium poa* in Persian. *Medical Plant* 2006; 6 (1): 26-32.
4. Bahraminejad S, Asenstorfer RE, Riley IT, Zwer P, Schultz CJ and Schmidt O. Genetic variation of flavonoid defense compound concentration in oat (*Avena sativa* L.) entries and testing of their biological activity. Australasian Plant Breeding Conference, Christchurch, New Zealand 2008, 18 – 21, pp: 1127 - 32.
5. Bahraminejad S, Asenstorfer RE, Riley IT and Schultz CJ. Analysis of the antimicrobial activity of flavonoids and saponins isolated from the shoots oats (*Avena sativa* L.). *Journal of Phytopathol.* 2008; 156: 1 - 7.
6. Behnam S, Farzanah M and Ahmadzadah M. Composition and antifungal activity of essential oil of *Mentha piperita* in *in vitro*. Iranian Plant protection Congress. 2006, pp: 463.
7. Bouchra C, Achouri M, Idrissi HLM and Hamamovchi M. Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea*. *J. Ethnopharmacol.* 89 (1): 165 - 9.
8. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 1999; 12: 564 - 82.
9. Duarte MCT, Figueira GM, Sartoratto A and Garcia VL. 2005. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 97 (2): 305 – 11.
10. Edris AE and Farrag ES. Antifungal activity of peppermint and sweet basil essential oils and their major aroma constituents on some plant pathogenic fungi from the vapor phase. *Nahrung/Food* 2003; 47: 117 - 21.
11. Elahinia SA. Plant pathology and mycology and other causal agent of plant diseases. 2nd Edition. Guilan University Press, 2005, 647 pp.



12. Erturk O. Antibacterial and antifungal activity of ethanolic extracts from eleven spice plants. *Biologia, Bratislava* 2006; 61 (3): 275 – 8.
13. Ezzat SM. In vitro inhibition of *Candida albicans* growth by plant extracts and essential oils. *World Journal Microbiology and Biotechnol.* 2001; 757 - 9.
14. Foster S. Peppermint: *Mentha piperita*. American Botanical Council-Botanical Series, 1996; 36: 3 - 8.
15. Frérot A, Bagnoud A and Vuilleumier C. Menthofurolactone: a new p - menthane lactone in *Mentha piperita* L. *Analysis, Synthesis and Oil Factory Properties* 2002.
16. Hadian J, Tabatabaei SMF, Salehi P, Hajieghrari B and GhorbanPour MA. Phytochemical study of *Cymbopogon parkeri* Stapf. Essential oil and its biological activity against some phytopathogenic fungi. *Iranian J. Agric. Sci.* 2006; 37 (3): 425-431.
17. Hoffmann BG and Lunder LT. Flavonoids from *Mentha pipertia* leaves. *Planta Med.* 1984; 50 (4): 361.
18. Iserin P. Encyclopedies des plants medicinal: identification, preparation, soins. Larousse/ VUEF. 2001, 334 pp.
19. Jens R. Monoterpene composition of essential oil from peppermint (*Mentha piperita* L.) with regard to leaf position using solid-phase micro extraction and gas chromatography/mass spectrometry analysis. *J. Agric. Food Chem.* 1999; 47 (9): 3782 - 6.
20. Karamlou N. Study and standardization of essential oil of *Mentha piperita* cultivated in the different parts of Iran. Thesis, University of Tehran, Medical Science. 1999.
21. Lawrence BM. Composition of three oils of *M. pulegium* produced from plant grown in North Carolina. *Perf. Flav.* 1998; 76 (7 - 8): 691 - 6.
22. Marzuk Z, Marzuk B, ehraief I and Boukef K. Analysis of Tunisian *Mentha pulegium* L. oils from Monastir. *SIPAM.* 2006.
23. McCaskill D and Croteau R. Monoterpene and sesquiterpene biosynthesis in glandular trichomes of peppermint (*Mentha piperita*) rely exclusively on plastid-derived isopentenyl diphosphate. *Planta* 1995; 1432 - 2048.
24. Meliss TGS, Sponia MS, Terezinha GFMB, Cardarelli P and Therezinha CBT. Studies on antimicrobial activity in vitro of *Physalis angulata* L. (*Solanaceae*) fraction and physalin B bringing out the importance of assay determination. *Mem inst Oswaldo Cruz Rio de janerio.* 2005; 100 (7): 779 - 82.
25. Moreira MR, Ponce AG, Valle CED and Roura SI. 2005. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT.* 38: 565 – 70.
26. Mucciarelli M, Scannerini S, Bertea C and Maffei M. In vitro and in vivo peppermint (*Mentha piperita*) growth promotion by non-mycorrhizal fungal colonization. *New Phytologist* 2003; 158 (3) 579 – 91.
27. Murray MT. The healing power of herbs: the enlightened persons guide to the wonders of medicinal plants. Rockin, CA: *Prima Pub.* 1995; xiv, 410.
28. Muyima NYO, Nziweni S and Mabinya LV. Antimicrobial and antioxidant activities of *Tagetes mimuta* *Lippia javanica* and *Foeniculum vulgar* essential oils from eastern cape province of south Africa. *JEOBP.* 2004; 7: 68 - 78.
29. Pavela R. Insecticidal activity of some essential oils against larvae of *Spodoptera littoralis*. 2005. *Fitoterapia* 76 (7 - 8); 691 - 6.
30. Pawar VC and Thaker VS. 2007. Evaluation of the anti-*Fusarium oxysporum* f. sp *cicer* and anti-*Alternaria porri* effects of some essential oils. *World J. Microbial. Biotechnol.* 23: 1099 - 106
31. Peirce A. The American Pharmaceutical Association practical guide to natural medicines. New York: William Morrow and Company, Inc. 1999.
32. Pitaroki D, Couladis M, Ptsikos-Panayotarou



- N and Tzakou O. Composition and antifungal activity on soil-borne pathogens of the essential oil of *Salvia sclarea* from Greece. *J. Agri. Food Chem.* 2002; 51: 3249 - 301.
33. Pitaroki D, Tzakou O, Loukis A and Harvala C. Volatile metabolites from *Salvia fruticosa* as antifungal agents in soil-borne pathogens. *J. Agri. Food Chem.* 2003; 51: 3249 - 301.
34. QUITANILLA P, ROHLOFF J and IVERSEN TH. Influence of essential oils on *Phytophthora infestans*. *Potato Res.* 2002; 45: 225 - 35.
35. Saremi H. Fusarium biology, ecology and taxonomy. Jahade Daneshgahi Press, Mashhad. 2005.
36. Schnelle FJ and Hoerst H. GLC-Analyse des Aetheris canen Oeles von *Mentha requiennii* (freiland = grow in open air). *Planta Med.* 1960; 16: 48 - 53.
37. Shariff N, Sudarshana MS, Umesha S and Hariprasad P. Antimicrobial activity of *Rauvolfia tetraphylla* and *Physalis minima* leaf and callus extracts. *African Journal of Biotechnol.* 2006; 5 (10): 946-950.
38. Sufferdini JB, Sader HS, Goncalves AG, Reis AO, Gales AC, Varella AD and Younes RN. Screening of antimicrobial extracts from plants native to the Brazilian Amazon rainforest and Atlantic forest. *Brazil. J. Med. Res.* 2004; 37: 379 - 84.
39. Tassou CC, Drosinos EH and Nychas GJE. Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4° and 10°C. *Journal of Applied Microbiol.* 1995; 78 (6) 593 – 600.
40. Toshio I, Sugimoto Y, Masuda H and Kamei C. Anti-allergic effect of flavonoid glycosides obtained from *Mentha piperita* L. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2002; 25 (2): 256.
41. Yadegariani D, Shakiba AM, Taghizadeh M, Rezaei MB, Gachkar L and Rassoli I. Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils. *Phytochem.* 2006; 67: 1249 - 55.
42. Yazdani D, Jamshidi AH, Mojab F. Comparison on menthol content of cultivated peppermint at different regions of Iran, *Journal of Medicinal Plants* 2002; 1 (3): 73 - 7. (Persian)

