

## 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- دانش آموخته 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 رازی، کرمانشاه

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

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

تلفن: ۰۹۱۸۳۳۷۵۱۹۵، همراه: ۰۸۳۷۲۲۴۱۴۴

پست الکترونیک: mojtabaabdalolmalki@gmail.com

تاریخ تصویب: ۲۲/۳/۸۹

تاریخ دریافت: ۱۶/۵/۸۷

### 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 حلal 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، مтанول، اتانول، استون و کلروفرم استخراج شد. تأثیر عصاره‌ها بر روی چهار گونه قارچ بیماری‌زای گیاهی، شامل *Rhizoctonia solani*, *Bipolaris sorokiniana* و *Phytophthora drechsleri*, *Fusarium oxysporum* با 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 مтанول و استون تأثیر کمی بر رشد میسلیومی قارچ *Fungistatic* *B. sorokiniana* داشتند و عصاره اتانولی و کلروفرمی به کلی فاقد اثر قارچ ایستایی *B. sorokiniana* بودند. در بررسی شبی غلظت عصاره، *B. sorokiniana* و *F. oxysporum* در غلظت دو میلی‌گرم بر دیسک کاغذی، تحت تأثیر قرار گرفتند؛ حال آنکه رشد میسلیومی 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 پی پی ام به طور کامل از رشد *P. drechsleri* در غلظت ۱۰۰۰ پی پی ام از رشد *B. sorokiniana* جلوگیری کرد. حال آن که در مورد دو قارچ دیگر حتی در غلظت ۲۰۰۰ پی پی ام 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.

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

<sup>1</sup> *M. piperita*



## مقدمه

شیمیایی ایزومتول، پلی‌کون، نئومتول، متول، پیپریتون و نوازیدومتول در روغن گیاه مشخص شده است [۲۱، ۳۵، ۳۶]. منوترین‌ها و سزکوئی‌ترین‌ها نیز در گیاه نعناع فلفلی سنتز می‌شود [۲۳]. ترکیبات متول، اتیل استات و نئومتول در اندام‌های مسن گیاه بیشتر وجود دارد در حالی که متول و ایزومتول 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، ناربروتین، هیپریدین، لوتویولین ۷ - او - روتنوساید، ایزوروبیفولین، دیوسمین و همچنین رزماریک اسید در جنس *M. pipertia* وجود دارد [۴۰]. وجود ترکیب متوفولاتکتون نیز در اندام‌های هوایی نعناع فلفلی گزارش شده است [۱۵]. انسانس این گیاه حداقل ۵ درصد استر و حداقل ۵۰ درصد متول به حالت استری یا آزاد، ۵ - ۳ درصد متون و مقدار کمی سینثول و دیگر ترین‌ها را دارا می‌باشد [۲۰].

**قارچ** *Bipolaris* که تئومورف آن *Cochliobolus* می‌باشد عامل پوسیدگی معمولی ریشه، لکه قهوه‌ای برگ، سوختگی خوش 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>۱</sup> Vascular wilt

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 ضدبacterیایی، ضدقارچی و حشره‌کشی انسان‌ها و عصاره‌های گیاهی پرداخته‌اند [۳۳، ۲۸]. فعالیت ضدمیکروبی و حشره‌کشی انسان‌ها 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 Lamiaceae از جمله گیاهان دارویی و معطری است که انسانس آن مصارف دارویی، غذایی، آرایشی و بهداشتی فراوانی دارد. این گونه، هیبریدی است که از تلاقی بین گونه‌های *Mentha spicata* و *Mentha aquatica* به دست آمده است [۱۴، ۳۱]. ترکیبات موجود در این گیاه دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی، قارچ‌کشی و حشره‌کشی می‌باشند [۷، ۱۸، ۲۹، ۴۱]. خاصیت ضدمیکروبی آن علیه *Escherichia coli*, *Candida albicans* و *Staphylococcus aureus* 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 انسانس 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



**عصاره‌گیری با متابولیت:** در این روش مقدار پنج گرم از بافت آسیاب شده در ۱۰۰ میلی‌لیتر متابولیت 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 متابولیتی تبخیر متابولیت 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، متابولی، اتانولی و کلروفرمی به ترتیب از حلال‌های آب، متابولی ۴۵ درصد، اتانول ۴۵ درصد و کلروفرم استفاده شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از هر نمونه معادل ۵ میلی‌گرم (طی پنج مرحله، هر بار ۱۰ میکرولیتر) با استفاده از سempler روی دیسک‌های کاغذ صافی به قطر شش میلی‌متر بارگذاری شده و

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

این مطالعه، با هدف بررسی وجود یا عدم وجود فعالیت ضدقارچی عصاره نعناع فلفلی بر چهار گونه قارچ بیماریزا گیاهی (*R. solani*) از بازیدیومیست‌ها، *P. drechsleri* از *F. oxysporum* و *B. sorokiniana* 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. sorkiniana* (جدا شده از ریشه گندم) که قبلاً بیماریزایی آن‌ها روی میزبان مربوطه اثبات شده بود، استفاده شد.

### آماده‌سازی بافت گیاهی

گیاه نعناع 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 آون در دمای ۵۵/۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد [۳].

<sup>1</sup> paper disc



قرار داده شد تا دمای آن به حدود ۴۵ درجه سانتی گراد برسد. در این مرحله، مقادیر عصاره تهیه شده درون میکروتیپ‌های یک و نیم میلی‌لیتری به هم زده شد تا امولسیون یکنواخت به دست آید. محیط‌های تهیه شده بلا فاصله درون پتری‌های یکبار مصرف نه سانتی‌متری تقسیم شد و اجازه داده شد تا محیط کشت منعقد شود. سپس دیسک‌های قارچ به قطر شش میلی‌متر توسط چوب پنبه سوراخ کن از کشت‌های یک هفته‌ای تهیه و در قسمت وسط پتری حاوی محیط کشت قرار داده شد. بعد از این مرحله پتری‌ها در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری شدند تا زمانی که سطح محیط کشت پتری‌های شاهد توسط قارچ اشغال شود هر ۱۲ ساعت یکبار انداره‌گیری شد. این آزمایش در چهار تکرار انجام و نتایج به دست آمده نیز با تکرار مجدد کل آزمایش ثبت شد.

بررسی اثر قارچ‌کشی یا قارچ ایستایی عصاره‌ها، دیسک قارچی تیمارهایی که رشد قارچ در آنها مشاهده نشد روی محیط PDA واکنش 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، متابول، 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 شاعع هاله بازدارندگی عصاره آبی نعناع فلفلی در غلظت پنج میلی‌گرم بر دیسک کاغذی روی *B. sorokiniana* و *F. oxysporum* 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 سانتی گراد در انکوباتور، قطر کلنی رایزوکتونیا بعد از ۳۲ ساعت و سه قارچ دیگر بعد از ۷۲ ساعت در حدود سه سانتی‌متر رسید، سپس دیسک‌های حاوی عصاره، در مورد قارچ رایزوکتونیا 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 روی رو، 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 ۴۰، ۳۰، ۲۰، ۱۰ و ۴ 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، ۲۰۰۰ 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 سانتی گراد 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. عصاره های 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 غلظت های مختلف عصاره بر رشد میسلیومی قارچ ها 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 حلال های مختلف در غلظت پنج میلی گرم بر دیسک کاغذی روی قارچ های 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	*۷/۵۸±۰/۲۲	۱۲/۲۵±۰/۴۸	۷/۷۵±۰/۳۲	۹/۱۳±۰/۲۴
	متانول	NE	NE	NE	۵/۷۵±۰/۱۴
	اتانول	NE	NE	NE	NE
	استون	NE	NE	NE	۴/۰۵±۰/۲۱
	کلروفرم	NE	NE	NE	NE

\*: میانگین شعاع بازدارندگی بر حسب میلی متر ± خطای معیار، NE: فاقد تأثیر

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

غله ای	غله ای	قارچ			
		<i>R. solani</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>P. drechsleri</i>	<i>B. sorokiniana</i>
۰	۰	NE	NE	NE	NE
۱	۱	NE	NE	NE	NE
۲	۲	NE	*۴/۶۳±۰/۲۴	NE	۴/۵۳±۰/۲۱
۳	۳	NE	۸/۰۸±۰/۲۲	NE	۵/۳۸±۰/۲۴
۴	۴	۵/۳۰±۰/۳۴	۹/۶۵±۰/۳۲	۷/۰۳±۰/۳۷	۷/۳۸±۰/۲۴

جدول شماره ۳- قطر کلنی قارچ های *Bipolaris sorokiniana* و *Phytophthora drechsleri*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* و *Mentha piperita* در روش اختلاط با محیط کشت هفته پس از کشت در محیط های حاوی غلظت های مختلف غصاره آبی نعناع فلفلی (*Mentha piperita*)

غله ای	غله ای	قارچ			
		<i>R. solani</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>P. drechsleri</i>	<i>B. sorokiniana</i>
۰	۰	*۹۰/۰۰±۰/۰۰	۶۷/۶۰±۰/۲۳	۷۵/۵۱±۰/۶۴	۷۷/۳۱±۰/۴۸
۵۰۰	۵۰۰	۶۹/۰±۱/۴۰	۲۹/۱۹±۰/۸۶	۷/۰۰±۰/۰۰	۲۱/۰۰±۰/۵۹
۱۰۰۰	۱۰۰۰	۲۱/۲۵±۰/۸۵	۲۹/۲۵±۱/۱	۷/۰۰±۰/۰۰	۶/۰۰±۰/۰۰
۱۵۰۰	۱۵۰۰	۲۰/۷۵±۰/۸۵	۲۳/۲۵±۰/۶۳	۷/۰۰±۰/۰۰	۶/۰۰±۰/۰۰
۲۰۰۰	۲۰۰۰	۲۱/۵۰±۱/۰۴	۲۰/۲۵±۰/۷۵	۷/۰۰±۰/۰۰	۶/۰۰±۰/۰۰

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



بحث

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 نعنای 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.بی.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 کلینی 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 قبلًا 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 شبیغ تغییرات رشد نسبت به مقدار ماده مؤثره متفاوت باشد.

با توجه به این که شرایط جغرافیایی بر مقدار و حتی نوع متابولیت‌ها موثر 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 قارچ های مهم بیماریزای گیاهی را در شرایط آزمایشگاهی کنترل نماید. خاصیت ضد میکروبی انسان و عصاره نعناع فلفلی در مطالعات متعدد به اثبات رسیده است. عصاره انسان این گیاه موریزا و همکاران (۲۰۰۵) نشان دادند که انسان این گیاه دارای خاصیت ضد باکتریایی است. در مطالعه ای دیگر نشان داده شده است که انسان این گیاه قادر به توقف رشد *P. infestans* عامل بیماری بادزدگی سبب زمینی در شرایط آزمایشگاهی است و در آزمایش گلخانه ای موجب کاهش شدت بیماری سبب زمینی شده است [۳۴]. خاصیت ضد قارچی انسان نعناع فلفلی علیه قارچ *F. oxysporum* نیز به اثبات رسیده است [۳۰].

از آنجایی که تقریباً اغلب ترکیبات گیاهی که دارای خواص ضدمیکروبی 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 پیتیدها همچون فاباتین و انواع لکتین‌ها، هرچند دارای خواص دفاعی هستند با روش‌های معمول قابل استخراج نمی‌باشند. در مواردی، تانن‌ها و ترپنئیدها را نیز می‌توان در فاز آبی پیدا کرد اما در این مورد نیز اغلب از حلال‌هایی با قطبیت کمتر استفاده می‌شود.<sup>[۸]</sup> 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؛ ولذا 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



می باشند [۴،۵]. می توان این ترکیبات را به تنها یی 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 می باشد.

## تشکر و قدردانی

بدینوسیله از همکاری و مساعدت‌های بسیار شایبه جناب آقای دکتر عباس علی زمانی عضو محترم هیأت علمی گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی کرمانشاه تقدير و تشکر می شود.

کیفیت مقدار انسانس و مقدار ماده متول در نمونه‌های مختلف در اقلیم‌های مختلف متفاوت می باشد [۴۲]. لذا پیشنهاد می گردد که گیاه مذکور از رویشگاه‌های مختلف با شرایط اقلیمی متفاوت جمع آوری شده و تاثیر شرایط آب و هوایی بر میزان ترکیبات بازدارنده مورد بررسی قرار گیرد.

نعان فلفلی دارای ۱/۵ درصد روغن‌های فرار است که ۳۰ تا ۷۰ درصد آن را متول و استرهای متول تشکیل می دهد [۱]. با توجه به این موضوع که ترکیب متول بیشترین میزان متابولیت ثانویه موجود در انسان این گیاه می باشد و همچنین با در نظر گرفتن اینکه ترکیبات فلاونوئیدی به میزان ۱۲ درصد در انسان این گیاه وجود دارد و بر با در نظر گرفتن این که ترکیبات فلاونوئیدی دارای فعالیت ضدمیکروبی

## منابع

- Anonymous. Peppermint. In: Dombek C, ed. Lawerence Review of Natural Products. St. Louis: *Facts and Comparison*. 1990.
- Aridogan BC, Mumcu E, Ozbasar D, Demiric M, Kaya S and Baydar H. 2002. Antimicrobial activity and chemical composition of some essential oils. *Arch Pharm. Res.* 25 (6): 860 - 4.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Bouchra C, Achouri M, Idrissi HLM and Hamamovchi M. Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Movoccan Labiateae against *Botrytis cinerea*. *J. Ethnopharmacol.* 89 (1): 165 - 9.
- Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiolgy Reviews* 1999; 12: 564 - 82.
- Duarte MCT, Figueira GM, Sartoratto A and Garcia VL. 2005. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 97 (2): 305 – 11.
- 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.
- 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 phytopathgenic fungi. *Iranian J. Agric. Sci.* 2006; 37 (3): 425-431.
- 17.** Hoffmann BG and Lunder LT. Flavonoids from *Mentha piperita* 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, Berteia 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.** Murrray 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 minuta* *Lippia javanica* and *Foeniculum vulgar* essential oils from eastern cape province of south Africa. *JEOPB.* 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 pathgens. *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 Daneshghahi Press, Mashhad. 2005.
- 36.** Schnelle FJ and Hoerst H. GLC-Analyse des Aetheris canen Oeles von *Mentha requienii* (freiland = grow in open air). *Planta Med.* 1960; 16: 48 - 53.
- 37.** Shariff N, Sudarshana MS, Umeha 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)

