بررسی اثر ضد قارچی اسانس نعناع فلفلی بر رشد قارچ‌های *Rhizopus Stolonifer* و *Rhizoctonia Solani*

معصومه وکیلی قرطاول[۱]، حسین آروئی[۲*]، شیوا گلمحمدزاده[۳] و محبوبه ناصری[۴]

[۱]دانشجوی دکتری گیاهان داروئی و معطر گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

[۲]دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

[۳]استاد، گروه نانوفناوری دارویی و مرکز تحقیقات نانوفناوری، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

[۴]استادیار، گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربت حیدریه، تربت حیدریه

* نویسنده مسئول: aroiee@um.ac.ir

چکیده

پاتوژن‌های بیماری‌زا در پس از برداشت مشکلات بسیاری در اقتصاد غیرنفتی کشور وارد می‌کند. اهمیت پیشگیری و کنترل این عوامل در پس ازبرداشت از یک سو و بهبود سلامت غذایی از سوی دیگر، توجه مصرف کنندگان را به استفاده از متابولیت‌های ثانویه گیاهی معطوف کرده است. این مطالعه با هدف تعیین اثر اسانس نعناع فلفلی روی رشد پاتوژن‌های قارچی انجام شده است. فعالیت ضد قارچی اسانس نعناع فلفلی علیه پاتوژن‌های قارچی به روش انتشار از طریق چاهک بررسی شد. نتایج آزمایش ضد قارچی به روش انتشار از طریق چاهک نشان داد که اسانس نعناع فلفلی در غلظت ۲۰۰۰ میکرولیتر اسانس در یک لیتر محیط کشت، باعث بازدارندگی ۸۳/۱۵ درصد برای رشد قارچ *Rhizopus stolonifer* و میزان ۵۶/۸۳ درصد برای رشد قارچ *Rhizoctonia solani* گردید.

کلمات کلیدی: استولونیفر، رایزوپوس رایزوکتونیا سولانی، ضد قارچی و نعناع فلفلی

مقدمه

میوه‌ها و سبزیجات و در دسترس بودن آن‌ها نقش مهمی در تغذیه جمعیت جهان دارد. این محصولات برای تغذیه ضروری‌اند و مکمل رژیم غذایی می‌باشند (باقری و همکاران، ۱۳۹۲). متاسفانه بخش زیادی از محصولات تولید شده به راحتی بوسیله عوامل بیماری‌زای پس از برداشت از بین می‌روند که این امر باعث کاهش دسترسی اقشار مختلف به مواد غذایی مناسب و افزایش هزینه‌های تولید می‌گردد. در همین راستا، یکی از روش‌های نوین مبارزه با آفات و بیماریها در مدیریت پس از برداشت محصولات کشاورزی استفاده از عصاره‌های طبیعی گیاهان دارویی و اسانس های استخراجی آنها می‌باشد که اثرات ضد میکروبی آنها به اثبات رسیده است. اسانس‌های گیاهی گستره‌ی وسیعی از متابولیت‌های ثانویه را شامل می‌شوند که در بیشتر حالات دارای خاصیت ضد میکروبی[۱]، آنتی اکسیدانی[۲] و زیست تنظیمی هستند. از نظر شیمیایی اسانس‌ها حاوی ترکیبات پیچیده‌ای چون هیدروکربن‌ها، الکل‌ها، کتون‌ها، آلدئیدها و غیره در ترکیب آنها وجود دارد (Plotto *et al.*, 2003). اسانس‌ها کاندیدای خوب برای جایگزینی (جایگزین مناسبی برای) آفتکش‌های مرسوم هستند و مقالات بسیاری برای استفاده آن‌ها در سالهای اخیر منتشر شده است.

[1] - Antimicrobial
[2] - Antioxidant

IrHC2019

نعناع فلفلی با نام علمی *Mentha piperita* L، متعلق به خانواده Lamiaceae و بومی مناطق مدیتراته می‌باشد. این گیاه گونه‌ای هیبرید است که از تلاقی بین گونه‌های *Mentha aquatica* و *Mentha spicata* حاصل شده است. در سال ۱۹۹۳ نعناع فلفلی یک منبع غنی از روغن‌های فرار معرفی شد که مصارف غذایی عمده‌ای دارد و از نظر مصارف داروئی نیز به عنوان اسپاسمولیتیک، ضد باکتری و کمک کننده هضم غذا می‌باشد (Tylor, 1993). اجزاء و تر کیبات اصلی نعناع فلفلی و اجزاء برگ‌های آن بوسیله TLC بررسی شده است (Guedon and Pasquier, 1994). اسانس نعناع فلفلی یکی از پرکاربردترین اسانس‌های گیاهی است که عمدتا به علت وجود اجزای اصلی آن منتول و منتون باشد (Derwich *et al*., 2010). برگ‌های خشک شده نعناع فلفلی محتوی ۱ تا ۲/۵ درصد اسانس است که ۳۰ تا۷۰ درصد آن را منتول و استرهای منتول، میزان ۱۰ تا ۳۰ درصد منتون، حداکثر تا ۱۰ درصد منتیل استر و بقیه را سایر مشتقات مونوترپنی (پولگون، پیپریتون و منتوفوران) تشکیل می‌دهد (Murrray, 1995). در ایران درصد اسانس نعناع فلفلی وابسته به شرایط محیطی بوده و میزان آن بین ۱/۴۵ تا ۳/۲ درصد متغیر است که این مقدار تحت تأثیر فاکتورهای مختلف محیطی از جمله ارتفاع و طول مدت روشنایی می‌باشد (یزدانی و همکاران، ۱۳۸۱).

اهمیت پیشگیری و کنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی در فرایند پس ازبرداشت از یک سو و بهبود سلامت غذایی از سوی دیگر، توجه مصرف کنندگان را به استفاده از متابولیت‌های ثانویه گیاهی معطوف کرده است. بنابراین، این مطالعه با هدف تعیین اثر اسانس نعناع فلفلی روی رشد پاتوژن‌های قارچی انجام شده است.

مواد و روش‌ها

تهیه و شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس

اسانس نعناع فلفلی از شرکت داروسازی باریج اسانس تهیه شد. سپس ترکیبات اسانس با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی شناسایی شد. مشخصات دستگاه GC کروماتوگرافی گازی مدل GC TRACE ساخت شرکت Finnigan-Thermoquest مجهز به آشکارساز (FID یونیزاسیون شعله هیدروژن) با ستون ۵ DB-به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلیمتر بود. برنامه ریزی حرارتی آون از ۶۰ تا ۲۵۰ درجه سانتیگراد با سرعت افزایش ۵ درجه در دقیقه انجام گردید. گاز حامل نیتروژن بود. حجم نمونه اسانس تزریق شده به دستگاه نیز ۰/۲ میکرولیتر بود.

تهیه سویه قارچی

قارچ *Rhizoctonia solani* از گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی دریافت شد و قارچ *Rhizopus stolonifer* از توت فرنگی‌های پوسیده تهیه و بر روی محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار[3] کشت داده شد.

روش انتشار بوسیله چاهک

در این روش پس از کشت پاتوژن قارچی بر روی محیط کشت، چاهک‌هایی بوسیله تیوب‌های استریل در محیط کشت ایجاد شد. پس از شروع به رشد قارچها، غلظت‌های مختلف اسانس (۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میکرولیتر بر لیتر محیط کشت) درون چاهک‌ها ریخته شد. اسانس به آرامی طی مدت انکوباسیون به درون محیط کشت نفوذ می‌کند و باعث کنترل رشد میسلیوم قارچی می‌شود (Magaldi *et al*, 2004). درصد بازدارنگی غلظت‌های مختلف اسانس با استفاده از فرمول Abbott محاسبه شد.

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

[3] potato dextrose agar

IrHC2019

IP[4]: درصد بازدارندگی، dc[5]: میانگین قطر هاله رشد قارچ در تیمار شاهد و dt[6]: میانگین قطر هاله رشد قارچ در تیمار مورد نظر

آنالیز آماری

آزمایش بصورت طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام گرفت و مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن با سطح احتمال پنج درصد به کمک نرم افزار آنالیز SPSS با ورژن ۲۴ انجام شد.

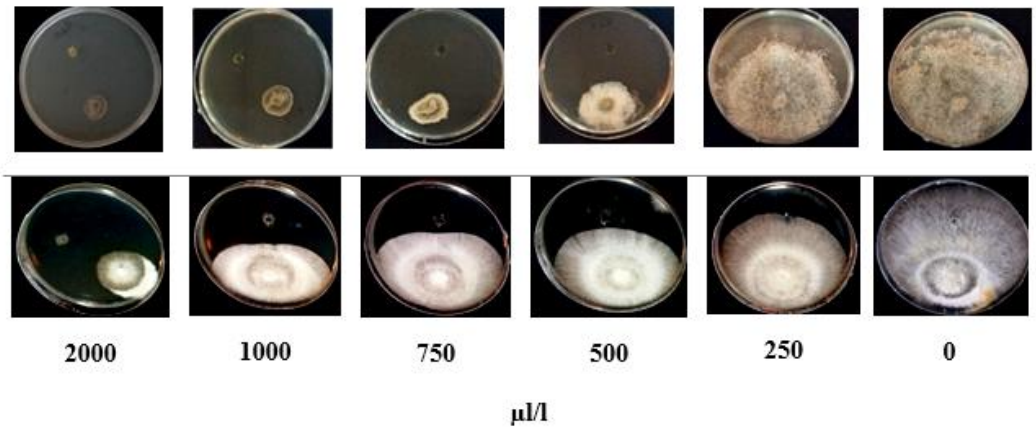
نتایج و بحث

ترکیبات موجود در اسانس

ترکیبات اسانس با دستگاه کروماتوگرافی گازی آنالیز شد. مهمترین ترکیبات اسانس نعناع فلفلی عبارت بودند از: منتول ۲۵/۸۷ درصد، پولگون ۲/۰۹ درصد، کارون ۰/۲۳ درصد، منتون ۲۲/۳۲ درصد، ایزومنتون ۶/۰۱ درصد، لیمونن ۳/۷۱ درصد و سینئول ۶/۹۶ درصد و بخش اعظم اسانس این گیاه را ترکیبات مونوترپنی تشکیل می‌دهند.

بررسی رشد میسلیوم قارچ‌ها در محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف تیمار

اثر سطوح مختلف اسانس نعناع فلفلی بر میزان رشد میسلیوم قارچ‌های مورد نظر در شکل ۱ آمده است. نتایج بدست آمده از بررسی اثر ضد قارچی اسانس نعناع فلفلی بر روی رشد قارچ‌ها نشان داد که با افزایش غلظت اسانس نعناع فلفلی میزان بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچی افزایش یافته است. قارچ *Rhizopus stolonifer* در طول مدت سه روز و قارچ *Rhizoctonia solani* در مدت ۵ روز کل پتری دیش شاهد را پر کرد. با توجه به شکل، سطوح مختلف اسانس نعناع فلفلی اثرات کنترل کنندگی بیشتری روی رشد میسلیوم قارچ *Rhizopus stolonifer* نسبت به قارچ *Rhizoctonia solani* دارد. به طوری‌که، نتایج آزمایش ضد قارچی به روش انتشار از طریق چاهک نشان داد که اسانس نعناع فلفلی در غلظت ۲۰۰۰ میکرولیتر اسانس در یک لیتر محیط کشت، باعث بازدارندگی ۸۳/۱۵ درصد برای رشد قارچ *Rhizopus stolonifer* و میزان ۵۶/۸۳ درصد برای رشد قارچ *Rhizoctonia solani* گردید.



شکل «۱» مقایسه اثرسطوح مختلف اسانس نعناع فلفلی در کنترل قارچ رایزوپوس استولونیفر (ردیف بالا) و رایزوکتونیا سولانی (ردیف پایین)

قابلیت تجزیه پذیری اسانس‌های گیاهی در طبیعت و سمیت پایین آنها برای انسان و سایر پستانداران و اثرات مخرب کمتر آنها در محیط زیست، این ترکیبات را به جایگزین و یا مکمل سموم شیمیایی جهت حفاظت محصولات

[4] Inhibitory percentage
[5] check
[6] treatment

IrHC2019

کشاورزی و انباری تبدیل کرده است (Mason *et al*.,2006). خاصیت ضد قارچی برخی گیاهان دارویی ازجمله رزماری، مری گلی، میخک، آویشن، مرزه، زیره، درمنه و نعناع در تحقیقات متعددی گزارش شده است (Farzaneh *et al*., 2006; and Hadian *et al*., 2007). همچنین گزارش شده است که بیشترین خاصیت ضد میکروبی اسانس گیاهان مربوط به ترکیبات مونوترپنی می‌باشد (Lis-Balchin *et al*., 2006). در تحقیق دیگر اثرات ضد کاندیدا آلبیکنز اسانس نعناع فلفلی بسیار قابل توجه بوده که می تواند ناشی از ماده کارون که ۸۷ درصد اسانس آن راتشکیل می دهد باشد (نایینی و همکاران، ۱۳۹۰). در نتیجه خاصیت ضد میکروبی اسانس نعناع فلفلی به درصد بیشتر ترکیبات مونوترپنی مرتبط می-باشد.

بنابراین باتوجه به نتایج این تحقیق کاربرد اسانس نعناع فلفلی برای مهار رشد پاتوژن‌های قارچی موثر و برای استفاده در فرایند پس از برداشت محصولات کشاورزی و صنایع غذایی قابل توصیه می‌باشد.

منابع

باقری، ع. نعمتی، ز. ناصری، م. ۱۳۹۲. تولید بذر سبزی‌ها. چاپ اول. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد.

نایینی، ع.، ناصری، م.، کمال نژاد، م.، خوش زبان، ف.، رجبیان، ط.، اسماعیل زاده نامی، ح. و زاویه، داوود.۱۳۹۰. بررسی اثرات اسانس ها و عصاره های ۵۰ گیاه دارویی ایران روی سویه ای استاندارد کاندیدا آلبیکنس در شرایط آزمایشگاهی. ۱۰(۳۸): ۱۶۳-۱۷۲.

یزدانی، د.، جمشیدی، ا.ح. و مجاب، ف. ۱۳۸۱. مقایسه میزان اسانس و منتول موجود در نعناع فلفلی کاشته شده در مناطق مختلف کشور. فصل نامه علمی و پژوهشی گیاهان دارویی. جلد۳ (۳).۷۳-۷۷.

Derwich, E., Benziane, Z., Taouil, R., Senhaji, O. and Touzani, M. 2010. Aromatic plants of morocco: GC/MS analysis of the essential oils of leaves of *Mentha piperita*. Advances in Environmental Biology, 80-86.

Farzaneh, M., Ahmadzadeh, M., Hadian, J. and Tehrani, A. S. 2006. Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of three species of *Artemisia* on some soil-borne phytopathogens. Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences, 71(3 Pt B): 1327-1333.

Guedon, D. J. and Pasquier, B. P. 1994. Analysis and distribution of flavonoid glycosides and rosmarinic acid in 40 *Mentha x piperita* clones. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42(3: Ghorbani, M. 2007. Chemical Compositions of Essential Oil of *Artemisia khorasanica* Podl. and its Antifungal Activity on Soil-Born Phytopathogens. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 10(1): 53-59.

Lis-Balchin, M., Deans, S. G. and Eaglesham, E. 1998. Relationship between bioactivity and chemical composition of commercial essential oils. Flavour and Fragrance Journal, 13(2): 98-104.

Magaldi, S., Mata-Essayag, S., De Capriles, C. H., Perez, C., Colella, M. T., Olaizola, C. and Ontiveros, Y. 2004. Well diffusion for antifungal susceptibility testing. International journal of infectious diseases, 8(1): 39-45.

Mason TG, Wilking JN, Meleson K, Chang C B and Graves S. 2006. Nanoemulsions: formation, ucture and physical properties, Journal of Physics: condensed matter, 18: 35-66.

IrHC2019

Murrray, M. T. 1995. The healing power of herbs: the enlightened persons guide to the wonders of medicinal plants. Rockin, CA: Prima Pub.

Plotto, A., Roberts, R.G., and Roberts, D.D. 2003. Evaluation of plant essential oils as natural postharvest disease control of tomato (*Lycopersicon esculentum*), Acta Horticulture, 628: 737 - 745

Tylor, V.E. 1993: The honest herbal. Binghamton. Pharmaceatrial Products press.

Study of antimicrobial activity of peppermint essential oil against *Rhizopus Stolonifer* and *Rhizoctonia Solani*

Masoumeh Vakili-ghartavol[1], Hossein Arouiee[2,*], Shiva Golmohamadzadeh[3], Mahboobeh Naseri[4]
[1] PhD student of Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Khorasan Razavi, Azadi Sq.Mashhad, Iran; masume.vakili@yahoo.com
[2*] Associate Professor of Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Khorasan Razavi, Azadi Sq. Mashhad, Iran; aroiee@um.ac.ir
[3] Professor of Nanotechnology Research Center, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran; golmohamadzadehsh@mums.ac.ir
[4] Assistant Professor of Department of Plant productionT, Faculty of Agriculture, University Of Torbat Heydarieh, Torbat Heydarieh, Iran; m.naseri@torbath.ac.ir

[*]*Corresponding Author: aroiee@um.ac.ir*

Abstract

Post-harvest pathogens have a lot of damage to the country's non-oil economy. The importance of controlling microbial agents in the post-harvesting process on the one hand and improving the health of the diet has increased the use of secondary plant metabolites. Therefore, this study was conducted to determine the effect of peppermint essential oil on the growth of fungal pathogens. The antifungal activity of peppermint essential oil against fungal pathogens was investigated through method well diffusion. The results indicated that peppermint essential oil controlled the growth of fungal mycelium of *Rhizopus stolonifer* and *Rhizoctonia solani* in 2000 µl/l concentration of essential oil per liter of culture medium were nearly 83.15 and 56.83 percent, respectively.

***Keywords*:** Rhizoctonia Solani, Rhizopus Stolonifer, Antifungi, Menta piperita,

IrHC2019