Determination of Total Phenolic and Flavonoid Contents, Radical Scavenging Identification of Chemical Compounds of Bitter Melon (*Momordica charantia*) Extracts and its Antimicrobial Activity Against Some Phytopathogenic Bacteria and Fungi

Pages 73-87

A. Hashemi[1*], A. Shahani[2]& A. Ali Dehpour[3]

1) Assistant Professor, Agriculture department, University of Applied Science and Technology, Sari, Iran.

2) Instructor, Agriculture department, University of Applied Science and Technology, Sari, Iran.

3) Assistant Professor, Department of Biology, Qaemshahr Branch, Islamic Azad University, Qaemshahr, Iran.

*Corresponding author**: a_hashemi2004@yahoo.com**

Received date: 2023.02.27 **Accepted date: 2023.05.21**

Abstract

Bitter melon is a tropical plant known for its intense bitterness and long-standing use as a medicinal herb. Observing the effective antimicrobial properties of the bitter melon extract against pathogenic microbes such as fungi and bacteria prompted this study. The aim was to investigate the chemical compounds of the extract from the ripe fruit of this plant and its effects on the growth and reproduction of certain plant pathogenic fungi and bacteria. Ripe fruits of bitter melon were collected, dried, and extracted using ethanol and ethyl acetate as solvents. The antimicrobial effects were assessed using dilution methods to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) for fungal and bacterial growth, minimum fungicidal concentration (MFC), and minimum bactericidal concentration (MBC). The disk diffusion method was used to measure the inhibition zone diameter. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was employed to identify and quantify the secondary metabolites present in the extracts. The ethanolic and ethyl acetate extracts exhibited varying inhibitory, fungicidal, and bactericidal effects, with fungi being more susceptible than bacteria. The GC-MS analysis revealed that the major compound in the ethyl acetate extract was tetradecanoic acid (49.6%), and in the ethanolic extract, it was ethylene sulfide (Thiirane) (72.9%), both of which have antimicrobial properties. The results of this study showed the metabolites present in the bitter melon fruit extract demonstrated inhibitory effects on the studied pathogenic microbes and fungi.

Keywords: Disc diffusion, GC-MS analysis, Inhibitory effect, Microdilution broth method and Secondary metabolite.

شناسایی ترکیبات شیمیایی عصاره میوه خیار تلخ (*Momordica charantia*) و اثرات ضد میکروبی آن روی برخی باکتری‌ها و قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی

شماره صفحات
۷۳-۸۷

آمنه سادات هاشمی*[۱]، اسد شاهانی[۲] و عباسعلی دهپوری[۳]

۱) استادیار گروه کشاورزی، دانشگاه جامع علمی کاربردی، ساری، ایران.
۲) مربی گروه کشاورزی، دانشگاه جامع علمی کاربردی، ساری، ایران.
۳) استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائمشهر، قائمشهر، ایران.

* نویسنده مسئول: **a_hashemi2004@yahoo.com**

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۳۱

چکیده

خیار تلخ (Bitter melon) یک گیاه گرمسیری و بسیار تلخ است که از دیرباز به عنوان گیاه دارویی مصرف می‌شد. با توجه به مشاهده اثرات موثر عصاره خیار تلخ بر عوامل میکروبی بیماری‌زا مانند قارچ‌ها و باکتری‌ها، این مطالعه جهت بررسی ترکیبات عصاره حاصل از میوه رسیده این گیاه و اثر آن بر رشد و تکثیر برخی قارچ‌ها و باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی انجام گردید. برای انجام این آزمایش، میوه رسیده این گیاه جمع‌آوری و خشک شد و با کمک حلال‌های اتانول و اتیل‌استات عصاره‌گیری صورت گرفت. از روش رقت‌سازی برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد قارچ و باکتری (MIC)، حداقل غلظت کشندگی قارچ (MFC) و باکتری (MBC) و از روش انتشار در دیسک برای اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد استفاده شد تا اثرات ضد میکروبی این عصاره بررسی گردد. همچنین به منظور شناسایی و تعیین درصد متابولیت‌های ثانویه موجود در عصاره‌های استخراج شده از میوه گیاه خیار تلخ از دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی (GC-MS) استفاده گردید. نتایج حاصل از بررسی نشان داد که عصاره اتانولی و اتیل‌استات اثر مهارکنندگی، اثر کشندگی و نیز قطر هاله عدم رشد متفاوتی بر روی قارچ‌ها و باکتری‌های مورد مطالعه داشت و اثرات آن روی قارچ‌ها نسبت به باکتری‌ها بیشتر بود. نتایج حاصل از مطالعه آنالیز GC-MS نشان داد که عمده‌ترین ترکیب از ترکیبات شناسایی شده در عصاره اتیل‌استات، ترادکانوئیک اسید (۴۹/۶ درصد) و در عصاره اتانولی، اتیلن سولفید (تییران) (۷۲/۹ درصد) بود که دارای اثرات ضدمیکروبی نیز می‌باشند. در کل نتایج حاصل نشان داد، متابولیت‌های موجود در عصاره میوه خیار تلخ بر میکروب‌ها و قارچ‌های بیماریزای مورد مطالعه دارای اثر بازدارنده است.

کلمات کلیدی: آنالیز کروماتوگرافی گازی، اثر بازدارنده، روش انتشار در دیسک، روش رقت‌سازی و متابولیت‌های ثانویه.

مقدمه

خیار تلخ (Bitter melon) با نام علمی *Momordica charantia* از خانواده Cucurbitacea، یک گیاه گرمسیری است که در آسیا و آفریقا رشد می‌کند و بسیار تلخ است. واریته‌های مختلفی از این گیاه وجود دارد که از لحاظ شکل و میزان تلخی میوه متفاوت هستند. این گیاه در کشورهای آسیایی و آفریقایی از دیرباز به عنوان گیاه دارویی مصرف داشته است و از مهم‌ترین خواص دارویی آن می‌توان به فعالیت‌های ضد دیابتی (Tan *et al*., 2008)، کاهش‌دهنده تری‌گلیسرید (Senanayake *et al*., 2004)، اثرات ضد سرطانی (Ru *et al*., 2011; Lee-Huang *et al*., 1995)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی (Semiz and Sen, 2007)، اثرات ضد HIV (Lee-Huang *et al*., 1995) و درمان عفونت‌ها اشاره کرد (Braun and Cohen, 2015). علاوه بر خواص دارویی، اثرات سمی موثر بر عوامل میکروبی بیماری‌زا مانند قارچ‌ها و باکتری‌ها و همچنین آفات محصولات کشاورزی مشاهده شده است (Yaldız *et al*., 2014; Telang *et al*., 2003).با توجه به اثرات خطرناک استفاده از سموم شیمیایی در سلامت انسان‌ها و نیز افزایش مصرف غذاهای ارگانیک و محصولات طبیعی و گرایش به کشاورزی ارگانیک، سموم بیولوژیک مورد توجه قرار دارد. علاوه بر این میکروارگانیسم‌ها به لحاظ ژنتیک قادر به ایجاد مقاومت در خود نسبت به سموم شیمیایی هستند (Fernandez-Ortuno *et al*., 2008; Avenot *et al*., 2010; Davies and Davies, 2010). از آنجا که یکی از دلایل استفاده از خواص ضد میکروبی گیاهان دارویی حل این معضل است، می‌توان در کنترل میکروارگانیسم‌های مقاوم از آن‌ها بهره برد (Eloff, 1998). عواملی مانند ناسازگاری میکروارگانیسم‌ها علیه برخی پاتوژن‌های گیاهی به‌طور گسترده در کنترل بیولوژیک بررسی شدند و مشخص شد که تعدادی از گونه‌های باکتریایی و قارچی به شکل موثری علیه برخی عوامل بیماری‌زا عمل می‌کنند (Cook *et al*., 1996). همچنین وجود برخی ترکیبات روغنی و فنولی ساخته شده در گیاهان می‌تواند به عنوان سموم کشاورزی برای کنترل طیفی از بیماری‌های گیاهی مفید باشد (Yangui *et al*., 2010). گیاه خیار تلخ حاوی ترکیباتی است که نشان داد در برابر آفات و بیماری‌ها آسیب‌پذیری کمتری دارد (Robinson and Decker-Walters, 1997). عمده ترکیبات موجود در این گیاه شامل فنول (Wu and Ng, 2008; Horax *et al*., 2005)، فنولیک اسید (Horax *et al*., 2005)، فلاونوئیدها (Wu and Ng, 2008)، گلیکوزیدها، ساپونین‌ها، آلکالوئیدها و رزین‌ها (Kumar *et al*., 2010) می‌باشند. سیستم‌های پاسخ به استرس آنتی‌اکسیداتیو برای تحمل قارچ‌هایی که در معرض ترکیبات فنولی قرار می‌گیرند، ضروری هستند. Kim *et al* (2006) نشان دادند که این سیستم می‌تواند با استفاده از ترکیبات فنولی، برای کنترل فعالیت قارچی با اثر بازدارندگی در زنجیره تنفسی میتوکندریایی قارچ‌ها کنترل شود. آن‌ها گزارش کردند که برخی اجزاء فنولیک اسید می‌توانند چندین برابر بهتر از قارچ کش‌ها عمل کند. بنابراین این ترکیبات طبیعی می‌تواند برای تولید قارچ کش‌های تجاری موثر بوده و در بهبود و کنترل پاتوژن‌های آلوده‌کننده غذا استفاده شود. با توجه به این که خیار تلخ یکی از منابع مهم ترکیبات فنولی است (Bodoprost and Rosemeyer, 2009) می‌تواند برای تولید قارچ‌کش‌های طبیعی مورد بررسی قرار گیرد. Wang *et al* (2016) اثرات ضد

قارچی عصاره دانه خیار تلخ را بر روی قارچ بیماری‌زای گیاهی *Fusarium solani* را گزارش کردند. Yaldız *et al* (2014) با بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره اتانول میوه و دانه‌های خیار تلخ روی برخی باکتری‌ها در شرایط آزمایشگاهی، دریافتند که این عصاره‌ها دارای خواص ضد میکروبی بر چندین نوع باکتری است.این پژوهش به منظور بررسی ترکیبات شیمیایی و متابولیت‌های ثانویه گیاه خیار تلخ با آزمایش عصاره حاصل از میوه رسیده آن بر رشد و تکثیر برخی از قارچ‌ها و باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی انجام شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری گیاه

به منظور انجام این آزمایش، میوه رسیده گیاه خیار تلخ که در اراضی کشاورزی شهرستان سیمرغ (کیاکلا) استان مازندران با طول جغرافیایی ۳۶/۵۶ و عرض جغرافیایی ۵۲/۸۱ کشت شده و کلیه عملیات زراعی مربوط به آن انجام شده بود، برداشت گردید و پس از شستشو با آب در دستگاه خشک‌کن و دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت خشک شده و کاملا پودر گردید.

عصاره‌گیری از نمونه

برای تهیه عصاره از روش Holopainen *et al* (1988) با کمی تغییرات استفاده شد. به این منظور دو حلال اتانول و اتیل‌استات به‌کار گرفته شد، به‌طوری که ۱۰۰ میلی لیتر از هر یک از حلال‌ها به ۴۰ گرم از پودر میوه رسیده اضافه شد و برای تهیه عصاره خالص، ابتدا محلول به مدت ۷۲ ساعت داخل دستگاه شیکر گذاشته شد و پس از صاف کردن با کاغذ واتمن و با استفاده از روش تبخیر در خلاء با دستگاه روتاری، حلال آن خارج شد و سپس در محلول ۱۰ درصد دمتیل‌سولفوکسید (DMSO) حل گردیده و در یخچال نگهداری شد.

باکتری‌ها و قارچ‌های مورد بررسی

باکتری‌های مورد آزمایش شامل *Escherichia coli*، *Pseudomonas syringae. pv syringae* (عامل بیماری شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار) و *Rathayibacter tritici* (عامل بیماری خوشه صمغی گندم) و قارچ‌های مورد مطالعه شامل *Verticillium dahliae* Kleb. (عامل بیماری پژمردگی ورتیسیلیوم پنبه) و *Fusarium verticillioides* (عامل بیماری فوزاریوم در ذرت) بودند.

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی قارچ (MFC) و باکتری (MBC)

جهت تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) قارچ و باکتری و یا حداقل غلظت کشندگی قارچ (MFC) و باکتری (MBC) از روش رقت‌سازی استفاده شد. برای قارچ‌ها ابتدا ۳۰۰ میکرولیتر از محیط کشت PD حاوی سوسپانسیون قارچ مورد مطالعه به ویال ۱/۵ میلی‌لیتری اضافه شد و سپس هر یک از عصاره‌ها برای غلظت نهایی ۱۰، ۲۰ و ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر،

به محیط کشت اضافه شد. در نهایت ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون قارچ‌های *Verticillium dahliae* و *Fusarium verticillioides* به صورت دو تیمار جداگانه به ویال‌ها افزوده گردید. یک ویال بدون عصاره گیاهی نیز به عنوان شاهد تهیه شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت به قارچ‌ها اجازه رشد داده شد. برای باکتری نیز ابتدا ۳۰۰ میکرو لیتر از محیط کشت NBC حاوی سوسپانسیون باکتری‌های مورد مطالعه به ویال ۱/۵ میلی‌لیتری اضافه شد و سپس هر یک از عصاره‌ها برای غلظت نهایی ۱۰، ۲۰ و ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، به محیط کشت اضافه شد. در نهایت ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون‌های باکتری‌های *Escherichia coli*، *Pseudomonas syringae* و *Rathayibacter tritici* به صورت سه تیمار جداگانه به ویال‌ها افزوده شد. یک ویال بدون عصاره گیاهی نیز به عنوان شاهد تهیه گردید و سپس به مدت ۲۴ ساعت به باکتری‌ها اجازه رشد داده شد. با کشت ۲۰ میکرولیتر از محتوی هر یک از ویال‌ها بر روی پتری‌دیش‌های حاوی محیط کشت NAS به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) مشخص گردید. همچنین کمترین غلظتی که در آن رشدی مشاهده نشد، به عنوان حداقل غلظت کشندگی قارچ (MFC) و باکتری (MBC) محاسبه شد. آزمایش در هر یک از نمونه در سه تکرار انجام گرفت.

تعیین قطر هاله عدم رشد

به منظور تعیین اثر ضد باکتریایی و ضد قارچی با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد، از هر یک از عصاره‌ها با غلظت نهایی ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر با روش انتشار در دیسک استفاده شد. دیسک‌های بلانک استریل در عصاره‌های مورد نظر به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد تا عصاره‌ها کاملا جذب دیسک‌ها گردد. سپس این دیسک‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا خشک شوند. برای بررسی اثر عصاره‌ها، باکتری‌ها و قارچ‌های مورد مطالعه، در پلیت استریل حاوی محیط PDA و Nutrient agar کشت و دیسک‌های آغشته به عصاره به همراه شاهد (آب مقطر استریل) به آن منتقل شد و سپس در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند. سپس روند تکثیر و رشد باکتری‌ها و قارچ‌ها در قالب "قطر هاله عدم رشد" در اطراف دیسک با خط‌کش میلی‌متری اندازه‌گیری شد (Alizadeh Behbahani *et al.*, 2014). برای هر یک از نمونه‌های مورد مطالعه، سه تکرار در نظر گرفته شد و جهت تجزیه و تحلیل آماری و مقایسه میانگین با روش دانکن نیز از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۰ استفاده گردید.

شناسایی ترکیبات شیمیایی عصاره

به منظور شناسایی و تعیین درصد متابولیت‌های موجود در عصاره‌های استخراج شده از میوه گیاه خیار تلخ از دستگاه کروماتوگرافی گازی (Agilent 7890A) متصل به طیف سنج جرمی (Agilent 5975C) با ستون DB-5 (۶۰ متر طول، ۰/۲۵ میلی‌متر قطر داخلی و ۰/۲۵ میکرومتر ضخامت) استفاده شد. دمای ستون به مدت ۴ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد

نگهداری شد و سپس تا ۲۴۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۵ درجه سانتی‌گراد در دقیقه افزایش یافت و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۴۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. گاز هلیم به عنوان گاز حامل با سرعت ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه با فشار ۱۶/۹۰۹ psi استفاده گردید. اجزای عصاره‌ها با مقایسه طیف جرمی و شاخص بازداری آن‌ها با اعداد استاندارد موجود در مراجع و طیف‌های جرمی استاندارد در کتابخانه‌های الکترونیک شناسایی شد.

نتایج

نتایج حاصل از بررسی اثرات ضد باکتریایی و ضد قارچی عصاره‌های حاصل از اتانول و اتیل‌استات، نشان‌دهنده اثرات متفاوت مهارکنندگی و کشندگی بر روی باکتری‌ها و قارچ‌های مورد مطالعه بود. با توجه به جدول ۱ عصاره اتانولی دارای اثر مهارکنندگی (MIC) در هر سه نوع باکتری بود، اما اثر کشندگی (MBC) نشان نداد. این در حالی است که عصاره اتیل‌استات تنها بر روی باکتری *Rathayibacter tritici* اثر مهارکنندگی نشان داد. حداقل غلظت مهارکنندگی رشد و کشندگی در دو قارچ *Fusarium verticillioides* و *Verticillium dahliae* بیانگر اثرات مطلوب عصاره‌های خیار تلخ بر روی قارچ‌های مورد مطالعه می‌باشد، به‌طوری‌که اثر مهارکنندگی (MIC) عصاره اتیل‌استات برای هر دو قارچ ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و MIC عصاره اتانول ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود (جدول ۲).

جدول ۱- اثر عصاره‌های اتانول و اتیل‌استات (بر حسب میلی‌گرم در میلی‌لیتر) روی حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل کشندگی باکتری‌ها (MBC)

Table 1. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of the ethanol and ethyl acetate plant extracts

عصاره	باکتری	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	Control+
	Escherichia coli	50	-	+
اتانول	*Pseudomonas syringae*	50	-	+
	Rathayibacter tritici	50	-	+
	Escherichia coli	-	-	+
اتیل استات	*Pseudomonas syringae*	-	-	+
	Rathayibacter tritici	50	-	+

+ عدم رشد – رشد

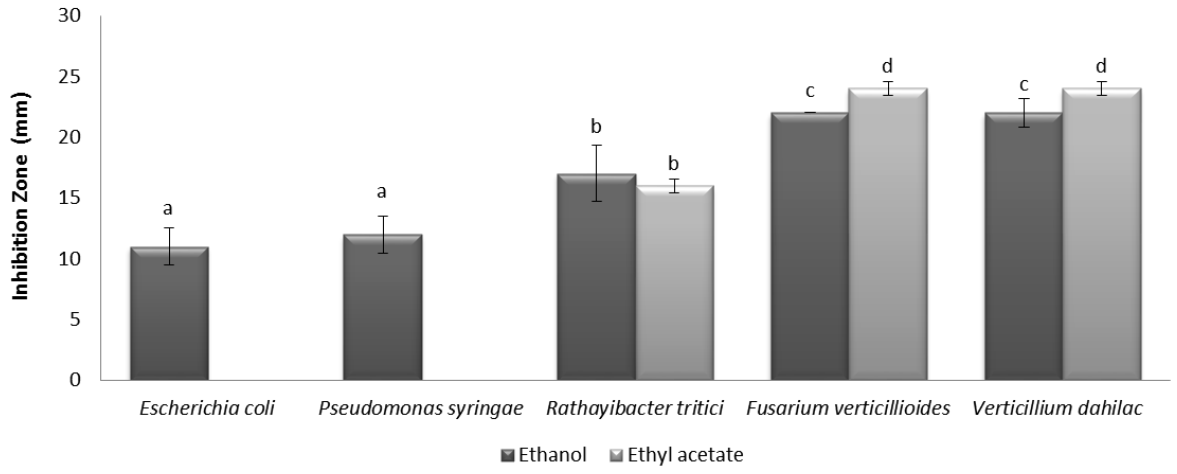
جدول ۲- اثر عصاره‌های اتانول و اتیل‌استات (بر حسب میلی‌گرم در میلی‌لیتر) روی حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل کشندگی قارچ‌ها (MFC)

Table 1. Minimum inhibitory concentration (MIC) minimum fungicide concentration (MFC) of the ethanol and ethyl acetate plant extracts

عصاره	قارچ	MIC (mg/ml)	MFC (mg/ml)	Control+
اتانول	*Fusarium verticillioides*	20	50	+
	Verticillium dahliae Kleb.	20	50	+
اتیل استات	*Fusarium verticillioides*	10	50	+
	Verticillium dahliae Kleb.	10	20	+

+ عدم رشد

با توجه به نتایج حاصل از حداقل غلظت مهارکنندگی رشد و کشندگی، غلظت نهایی ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر هر یک از عصاره‌ها برای روش انتشار در دیسک انتخاب شد. نتایج حاصل از بررسی اثرات ضد باکتریایی و ضد قارچی عصاره‌های حاصل از اتانول و اتیل‌استات، نشان‌دهنده اثرات متفاوت قطر عدم هاله رشد باکتری‌ها و قارچ‌های مورد مطالعه بود (شکل ۱). به‌طوری که بیشترین قطر عدم هاله رشد به ترتیب مربوط به قارچ‌های *Verticillium dahliae* (۰/۵۷±۲۴میلی‌متر) و *Fusarium verticillioides* (۱/۰۰±۲۵میلی‌متر) با عصاره اتیل‌استات بود که با سایر نمونه‌ها تفاوت معنی‌دار داشت.



شکل ۱- اثرات عصاره‌های اتانول و اتیل‌استات در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر روی قطر هاله عدم رشد (بر حسب میلی‌متر) باکتری‌ها و قارچ‌های مورد مطالعه

Figure 1. Effect of ethanol and ethylasetate extracts on inhibition zone (mm) of studied bacteria and fungi in 50 mg/ml concentration

نتایج حاصل از مطالعه فیتوشیمیایی GC-MS نشان داد که عمده‌ترین ترکیب موجود در عصاره اتیل‌استات، تترادکانوئیک‌اسید با ۴۹/۶ درصد از کل ترکیبات شناسایی شد. این ترکیب در عصاره اتانول ۲۷/۰ درصد از کل دو ترکیب ردیابی‌شده را به خود اختصاص داد. ترکیب اتیلن سولفید (تییران) در عصاره اتانول با ۷۲/۹ درصد از دو ترکیب شناسایی‌شده، مقدار قابل توجهی از عصاره را تشکیل داد. ترکیبات n-هگزادکانوئیک اسید (۱۹/۵ درصد) و۵- هیدروکسی‌متیل-۲-فوران‌کربوکسالدهید (۱۳/۶ درصد) در عصاره اتیل‌استات به ترتیب بیشترین مقدار ترکیبات را به خود اختصاص دادند (جدول

۳). کمترین مقادیر در عصاره اتیل‌استات نیز به ترتیب به ۲-متیل بوتانال (۴/۶۴ درصد)، ترانس-۱۳-اکتادکنوئیک اسید (۴/۵۷ درصد)، متیل سیکلوپنتان (۴/۴۷ درصد) و ۲و۳-دهیدرو-۳و۵-دهیدروکسی-۶-متیل-۴(H)-پیران-۴-وان (۳/۵۶ درصد) تعلق داشت.

جدول ۳- ترکیبات شیمیایی شناسایی شده عصاره اتیل‌استات و اتانول میوه خیار تلخ با آنالیز GC-MS

Table 3. Identified chemical compounds of ethyl acetate and ethanol extract from fruit of bitter melon by GC-MS

نام ترکیب	گروه شیمیایی	زمان نگهداری (دقیقه)	درصد از کل ترکیبات شناسایی شده در عصاره اتیل‌استات	درصد از کل ترکیبات شناسایی شده در عصاره اتانول
ethylene sulfide (Thiirane)	Sulfur	5.409	-	77.04
) Butanal, 2-methyl- (2-methylbutanal	Aldehyde	6.218	8.52	-
Methyl cyclopentane	Cycloalkane	6.744	7.34	-
		23.082	6.61	-
2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-(4H)-pyran-4-one	flavonoid			
5-Hydroxymethyl-2-furancarboxaldehyde	Furan aldehyde	25.034	14.18	-
Tetradecanoic acid	Fatty acid	39.553	34.46	-
Tetradecanoic acid	Fatty acid	39.397	-	22.96
n-Hexadecanoic acid	Fatty acid	44.173	21.34	-
trans-13-Octadecenoic acid	Fatty acid	48.043	7.51	-

بحث

در این مطالعه، عصاره میوه رسیده خیار تلخ در سطوح مختلف، اثرات ضد باکتری و ضد قارچی نشان داد و بهترین اثر کشندگی و همچنین قطر هاله عدم رشد مربوط به عصاره اتیل‌استات در قارچ *verticillium dahliae* بود که بیانگر حساسیت بیشتر قارچ‌های مورد مطالعه نسبت به عصاره‌ها می‌باشد. Atika *et al* (2021) با بررسی اثر عصاره متانولی برگ‌های گیاه خیار تلخ نشان دادند که این عصاره بر رشد قارچ‌های موردمطالعه اثر بازدارندگی دارد. Wang *et al* (2016) با بررسی عصاره دانه گیاه خیار تلخ، پنجاه درصد بازدارندگی در رشد میسل‌های قارچ بیماری‌زای گیاهی *Fusarium solani* گزارش کردند. Yaldız *et al* (2014) نیز با مطالعه عصاره اتانولی میوه خیار تلخ، اثرات ضد باکتریایی و ضد قارچی این عصاره را بر روی یک قارچ و دو باکتری مشاهده نمودند. همچنین عصاره اتانولی خیار تلخ بر روی باکتری *Escherichia coli* اثر داشت. Roopashree *et al* (2008) نیز اثرات ضد میکروبی عصاره خیار تلخ را بر روی باکتری‌های گرم منفی و مثبت مورد مطالعه خود، موثر گزارش کردند. Braca *et al* (2008) با استخراج روغن دانه این گیاه و Jagessar *et al* (2008) با استفاده از عصاره برگ آن، اثرات ضد میکروبی گیاه خیار تلخ را در باکتری‌ها و قارچ‌های بیماری‌زای انسانی مورد مطالعه، نشان دادند که در مقایسه با تحقیقات دیگر از عصاره برگ و میوه این گیاه، اثرات یکسانی روی میکروارگانیسم‌های مشابه مشاهده شد (Leelaprakash *et al*., 2011; Mwambete, 2009). Coutinho *et al* (2010) نیز عصاره اتانولی برگ گیاه خیار تلخ را به عنوان یک حربه جدید علیه باکتری‌ها با مقاومت چندتایی معرفی کردند. با توجه به مطالعه حاضر و تحقیقات دیگر محققان، اثرات ضد میکروبی

اندام‌های مختلف گیاه خیار تلخ ثابت شده است (Villarreal-La Torre *et al*., 2020). این خاصیت با توجه به اثراتی که این گیاه در میکروارگانیسم‌ها به جای می‌گذارد، قابل توجیه است. از آن جمله می‌توان در قارچ‌ها به فرایندهایی همچون تغییر شکل سلول‌ها با جوانه‌زنی نامنظم، از بین رفتن یکپارچگی دیواره سلولی، جدا شدن سیتوپلاسم از دیواره سلولی، شکستگی غشا سلولی و مرگ سلولی (Wang *et al*., 2016; Wang *et al*, 2012) اشاره کرد.

مبارزه با میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای گیاهان به لحاظ ادامه حیات در فصل‌های مختلف رشد، نیاز به سمپاشی‌های منظم و متعدد دارد که منجر به خطرات زیست محیطی می‌شود؛ به خصوص اگر بقایای آن در خاک ماندگار شده و وارد آب‌های زیرزمینی گردد. این مسئله مخاطراتی در سلامت انسان و اکوسیستم‌های خاکی و آبی ایجاد می‌کند (Wightwick *et al*., 2010). بنابراین برای حفظ تعادل در کنترل بیماری‌های گیاهی و سلامت اکوسیستم، استفاده از متابولیت‌های گیاهانی که توانایی توقف فعالیت ارگانیسم‌های بیماری‌زا را دارد، امری ضروری است. اسیدهای چرب شناسایی شده در این تحقیق شامل تترادکانوئیک اسید، n-هگزانوئیک اسید و ترانس-۱۳-اکتادکنوئیک اسید که درصد بالایی از ترکیبات شناسایی شده را به‌خود اختصاص دادند و در تحقیقات دیگر در خیار تلخ (Aiyelaagbe *et al*., 2010) و سایر گیاهان نیز درصد بالایی داشتند (Zhou *et al*., 2015; Sermakkani and Thangapandian, 2012; Hajji *et al*., 2010)، دارای خواص ضد باکتری و ضد قارچی هستند (Kacem *et al*., 2016; Carballeira, 2008; Bodoprost and Rosemeyer, 2007). اسیدهای چرب با افزایش سیالیت غشای سلولی قارچ‌ها و انتشار ترکیبات درون سلولی موجب مرگ سلولی قارچ‌ها می‌شوند (Pohl *et al*., 2011). بنابراین عصاره‌های حاصل از این گیاه با درصد بالای ترکیبات اسید چرب می‌تواند به منظور مبارزه با میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا مورد توجه قرار گیرد. ترکیب اتیلن سولفید (تییران) که در این مطالعه تنها در عصاره حاصل از اتانول ردیابی شده است، از گروه شیمیایی سولفورها محسوب می‌شود که نقش ضد میکروبی آن در مطالعه Vikram *et al* (2004) نیز بررسی شده است. با توجه به این که نقش ضد میکروبی اتیلن سولفید (تییران) و سولفورها در مطالعات گذشته ثابت شده است (Poroikov *et al*, 2017;Gándara-Ledezma *et al*., 2015; Kyung and Lee, 2001; Kyung and Fleming, 1997)، بنابراین می‌تواند در پاسخ دفاعی در مقابل پاتوژن‌های گیاهی موثر باشد. Stintzi *et al* (2001) با مطالعه نقش سیکلوپنتان‌ها در سیستم دفاعی گیاه، پیشنهاد کردند که این ترکیب در غیاب جاسمونیک اسید به عنوان یک تنظیم‌کننده کلیدی در قدرت دفاعی گیاه (Schenk *et al*., 2000)، می‌تواند در گیاه آرابیدوپسیس در مقابل قارچ‌ها و آفات مقاومت ایجاد کند. همچنین مشتقات دیگری از سیکلوپنتان‌ها شناسایی شدند که اثرات ضد ویروس موزائیک تنباکو را بدون ایجاد اثرات سمی در بافت برگ تنباکو نشان می‌دهد (Lapshina *et al*., 2012). بنابراین با توجه به حضور متیل سیکلوپنتان در عصاره حاصل از اتیل‌استات در مطالعه حاضر، می‌توان به نقش این ترکیب در ایجاد خاصیت ضد میکروبی توجه نشان داد. از طرف دیگر برخی محققان در مطالعات فیتوشیمیایی خود با استفاده از GC-MS بر روی خیار تلخ (Zulbadli *et al*., 2011) و گیاهان دیگر Gopalakrishnan)

and Udayakumar, 2014b; Gopalakrishnan, S., Vadivel, 2011)، برخی ترکیبات ردیابی شده در عصاره اتیل‌استات مطالعه حاضر مانند ۲-متیل بوتانال، ۲و۳-دهیدرو-۳و۵-دهیدروکسی-۶-متیل-۴(H)-پیران-۴-وان، ۵-هیدروکسی‌متیل-۲-فوران‌کربوکسالدهید و n-هگزادکانوئیک اسید را مشاهده کردند که اثرات ضد میکروبی برخی از آن ها نیز گزارش شده است (Teoh and Mashitah, 2016; Gopalakrishnan and Udayakumar, 2014a; Syed Ab Rahman *et al*., 2014; Joshi *et al*., 2010; Jayasinghe *et al*., 2002). همچنین این ترکیبات در قارچ‌های مورد مطالعه برخی محققان دیگر که اثرات بازدارندگی عصاره آن‌ها در رشد قارچ‌های بیماری‌زا بررسی و تائید شده نیز، گزارش شده است (Elsherbiny *et al*., 2015; Hamza *et al*., 2015). Lee *et al* (2012) وجود ترکیب ۵-هیدروکسی‌متیل-۲-فوران‌کربوکسالدهید را در عصاره قارچ *Streptomyces cavourensis* SY224 بررسی کردند و ممانعت از رشد میسل قارچ‌ها، تغییر در مورفولوژی هیف‌ها و ممانعت از جوانه‌زنی اسپورها را یکی از دلایل عمده برای اثر ضد قارچی آن عنوان نمودند.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر، اثرات ضد میکروبی عصاره میوه رسیده خیار تلخ حاصل از حلال‌های اتانول و اتیل‌استات را روی قارچ‌ها و باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی نشان داد. به‌طوری که اثرات ضد قارچی در هر دو مطالعه اثر کشندگی قارچ (MFC) و قطر هاله عدم رشد آن بیش از اثرات ضد باکتری بود. آنالیز فیتوشیمیایی این مطالعه نیز نشان داد که این گیاه دارای برخی متابولیت‌های ضد میکروبی می‌باشد. بنابراین، می‌توان پیشنهاد کرد که مجموعه این متابولیت‌های شناسایی شده در کنار متابولیت‌هایی که احتمالا ردیابی نشده‌اند، می‌تواند تایید کننده خواص ضد میکروبی این گیاه دارویی باشد و تکرار بررسی و مطالعه بیشتر جهت استفاده کاربردی از عصاره این گیاه در مقابله با عوامل بیماری‌زای گیاهی حائز اهمیت است.

منابع

Aiyelaagbe, O.O., Oladosu, I.A., Olaoluwa, O.O., Aboaba, S.A., Oloyede, G.K., and Onah, D.U., (2010). Chemical composition and cytotoxicity of the essential oil of Nigerian *Momordica charantia* (Hook). International Journal of Essential Oil Therapeutics, 4: 26-28.

Alizadeh Behbahani, B., Tabatabaei Yazdi, F., Shahidi, F., and Mohebbi, M., (2014). Antimicrobial effect of the aqueous and ethanolic Avicennia marina extracts on *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes* and *Pseudomonas aeruginosa*" in vitro". ISMJ, 17(5): 879-888.

Atika, B.N. (2021). Antifungal Activity of Pare Leaf (*Momordica charantia* L.) Methanol Extract. EVOLUSI: Journal of Mathematics and Sciences, 5(1):22-27.

Avenot, H.F., and Michailides, T.J., (2010). Progress in understanding molecular mechanisms and evolution of resistance to succinate dehydrogenase inhibiting (SDHI) fungicides in phytopathogenic fungi. Crop Protection, 29: 643-651.

Bodoprost, J., and Rosemeyer, H., (2007). Analysis of Phenacylester Derivatives of Fatty Acids from Human Skin Surface Sebum by Reversed-Phase HPLC: Chromatographic Mobility as a Function of Physico-Chemical Properties. International Journal of Molecular Sciences, 8: 1111-1124.

Braca, A., Siciliano, T., D'Arrigo, M., and Germanò, M.P., (2008). Chemical composition and antimicrobial activity of *Momordica charantia* seed essential oil. Fitoterapia, 79: 123-125.

Braun, L., and Cohen, M., (2015). Herbs and Natural Supplements, Volume 2: An Evidence-Based Guide. Elsevier Healh Sciences.

Carballeira, N.M., (2008). New advances in fatty acids as antimalarial, antimycobacterial and antifungal agents. Progress in Lipid Research, 47: 50-61.

Cook, R.J., Bruckart, W.L., Coulson, J.R., Goettel, M.S., Humber, R.A., Lumsden, R.D., Maddox, J.V., McManus, M.L., Moore, L., Meyer, S.F., Quimby, J.P.C., Stack, J.P., and Vaughn, J.L., (1996). Safety of Microorganisms Intended for Pest and Plant Disease Control: A Framework for Scientific Evaluation. Biological Control, 7: 333-351.

Coutinho, H.D. M., Costa, J.G.M., Falcão-Silva, V.S., Siqueira-Júnior, J.P., and Lima, E.O., (2010). Effect of *Momordica charantia* L. in the resistance to aminoglycosides in methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 33: 467-471.

Davies, J., and Davies, D., (2010). Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. Microbiology and Molecular Biology Reciews, 74: 417-433.

Eloff, J.N., (1998). Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? Journal of Ethnopharmacology, 60: 1-8.

Elsherbiny, E.A., Saad, A.S., Zaghloul, M.G., and El-Sheshtawi, M.A., (2015). Efficiency assessment of the antifungal metabolites from *Sclerotium cepivorum* against onion white rot disease. European Journal of Plant Pathology, 142: 843-854.

Fernández-Ortuño, D., Torés, J.A., Vicente, A.D., and Pérez-García, A., (2008). Mechanisms of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi. International Microbiology, 11: 1-9.

Gándara-Ledezma, A., Corrales-Maldonado, C., Rivera-Domínguez, M., Martínez-Téllez, M.Á., and Vargas-Arispuro, I., (2015). Post-harvest control of gray mold in table grapes using volatile sulfur compounds from *Allium sativum*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 95: 497-503.

Gopalakrishnan, K., and Udayakumar, R., (2014a). Antimicrobial Activity of *Marsilea quadrifolia* (L.) Against Some Selected Pathogenic Microorganisms. British Microbiology Research Journal, 4: 1046-1056.

Gopalakrishnan, K., and Udayakumar, R. (2014b)., GC-MS Analysis of Phytocompounds of Leaf and Stem of *Marsilea quadrifolia* (L.). British Microbiology Research Journal, 4: 217-526.

Gopalakrishnan, S., and Vadivel, E., (2011). GC-MS analysis of some bioactive constituents of *Mussaenda frondosa* Linn.. International Journal of Pharma and Bio Sciences, 2: 314–318.

Hajji, M., Jarraya, R., Lassoued, I., Masmoudi, O., Damak, M., and Nasri, M., (2010). GC/MS and LC/MS analysis, and antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts from *Mirabilis jalapa* tubers. Process Biochemistry, 45: 1486-1493.

Hamza, L.F., Kamal, S.A., and Hameed, I., (2015). Determination of metabolites products by *Penicillium expansum* and evaluating antimicobial activity. Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy, 7: 194-220.

Holopainen, M., Jabodář, L., Seppänen-Laaksoº, T., Laaksoº, I., and Kauppinen, V., (1988). Antimicrobial activity of some *Finnish Ericaceo* plants. Acta Pharmaceutica Fennica, 97:197-202.

Horax, R., Hettiarachchy, N., and Islam, S., (2005). Total Phenolic Contents and Phenolic Acid Constituents in 4 Varieties of Bitter Melons (*Momordica charantia*) and Antioxidant Activities of their Extracts. Journal of Food Science, 70: C275-C280.

Jagessar, R.C., A.Mohameda, and Gomes, G., (2008). An evaluation of the Antibacterial and Antifungal activity of leaf extracts of *Momordica Charantia* against *Candida albicans, Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Nature and Science, 6: 1545-0740.

Jayasinghe, U.L. B., Jayasooriya, C.P., Bandara, B.M.R., Ekanayake, S.P., Merlini, L., and Assante, G., (2002). Antimicrobial activity of some Sri Lankan Rubiaceae and Meliaceae. Fitoterapia, 73: 424-427.

Joshi, V.G., Patil, S.A., Sutar, P.S., Karigar, A.A., and Joshi, N.H., (2010). Aqueous extract of *Mussaenda frondosa* leaf has wound-healing and antibacterial activities in albino rats. Journal of Pharmacy Research, 3: 2020-2022.

Kacem, N., Roumy, V., Duhal, N., Merouane, F., Neut, C., Christen, P., Hostettmann, K., and Rhouati, S., (2016). Chemical composition of the essential oil from *Algerian Genista* quadriflora Munby and determination of its antibacterial and antifungal activities. Industrial Crops and Products, 90: 87-93.

Kim, J.H., Mahoney, N., Chan, K.L., Molyneux, R.J., and Campbell, B.C., (2006). Controlling food-contaminating fungi by targeting their antioxidative stress-response system with natural phenolic compounds. Applied Microbiology and Biotechnology, 70: 735-739.

Kumar, D.S., Sharathnath, K.V., Yogeswaran, P., Harani, A., Sudhakar, K., Sudha, P., and Banji, D., (2010). A medicinal potency of *Momordica charantia*. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, 1: 95-99.

Kyung, K.H., and Fleming, H.P., (1997). Antimicrobial Activity-of Sulfur Compounds Derived from Cabbage. Journal of Food Protection, 60: 67-71.

Lapshina, L., Shestak, O., Reunov, A., and Novikov, V., (2014). The antiviral activity of cyclopentane β, β′-triketones related to secondary metabolites of higher plants. Russian Journal of Bioorganic Chemistry, 40: 796-799.

Lee-Huang, S., Huang, P.L., Chen, H.C., Huang, P.L., Bourinbaiar, A., Huang, H.I., and Kung, H.f., (1995). Anti-HIV and anti-tumor activities of recombinant MAP30 from bitter melon. Gene, 161: 151-156.

Lee, S.Y., Tindwa, H., Lee, Y.S., Naing, K.W., S.H.H., Nam, Y., and Kim, K.Y., (2012). Biocontrol of anthracnose in Pepper using chitinase, beta-1,3 glucanase, and 2-furancarboxaldehyde produced by *Streptomyces cavourensis* SY224. Journal of Microbiology and Biotechnology, 22: 1359–1366.

Leelaprakash, G., Rose, J.C., Gowtham, B.M., Javvaji, P.K., and Prasad, S., (2011). *In vitro* antimicrobial and antioxidant activity of *Momordica charantia* leaves. Pharmacophore, 60: 413–418.

Mwambete, K.D., (2009). The in vitro antimicrobial activity of fruit and leaf crude extracts of *Momordica charantia*:A Tanzania medicinal plant. African Health Sciences, 9: 34-39.

Pohl, C.H., Kock, J.L. and Thibane, V.S., (2011). Antifungal free fatty acids: A review. Science against microbial pathogens: current research and technological advances, 1: 61-71.

Poroikov, V.V., Gloriozova, T.A. and Dembitsky, V.M. (2017). Natural occurring thiirane containing compounds: Origin, chemistry, and their pharmacological activities. The Pharmaceutical and Chemical Journal, 4(5): 107-120.

Robinson, R.W., and Decker-Walters, D., (1997). Cucurbits, Cab international.

Roopashree, T.S., Dang, R., Shobha Rani, R.H., and Narendra, C., (2008). Antibacterial activity of antipsoriatic herbs: Cassia tora. *Momordica charantia* and *Calendula officinalis*. International Journal of Applied Research in Natural Products, 1: 20-28.

Ru, P., Steele, R., Nerurkar, P.V., Phillips, N., and Ray, R.B., (2011). Bitter Melon Extract Impairs Prostate Cancer Cell-Cycle Progression and Delays Prostatic Intraepithelial Neoplasia in TRAMP Model. Cancer Prevention Research, 4: 2122-2130.

Schenk, P.M., Kazan, K., Wilson, I., Anderson, J.P., Richmond, T., Somerville, S.C., and Manners, J.M., (2000). Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. Proceedings of the National Academy of Sciences, 97: 11655-11660.

Semiz, A., and Sen, A., (2007). Antioxidant and chemoprotective properties of *Momordica charantia* L.(bitter melon) fruit extract. African Journal of Biotechnology, 6: 273-277.

Senanayake, G.V., Maruyama, M., Shibuya, K., Sakono, M., Fukuda, N., Morishita, T., Yukizaki, C., Kawano, M., and Ohta, H., (2004). The effects of bitter melon (*Momordica charantia*) on serum and liver triglyceride levels in rats. Journal of ethnopharmacology, 91: 257-262.

Sermakkani, M. and Thangapandian, V., (2012). Gc-ms analysis of cassia italica leaf methanol extract. Asian journal of pharmaceutical and clinical research, 5: 90-94.

Stintzi, A., Weber, H., Reymond, P., and Farmer, E.E., (2001). Plant defense in the absence of jasmonic acid: the role of cyclopentenones. Proceedings of the National Academy of Sciences, 98: 12837-12842.

Syed Ab Rahman, S.F., Sijam, K., and Omar, D., (2014). Chemical composition of Piper sarmentosum extracts and antibacterial activity against the plant pathogenic bacteria *Pseudomonas fuscovaginae* and *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. Journal of Plant Diseases and Protection, 121: 237-242.

Tan, M.J., Ye, J.M., Turner, N., Hohnen-Behrens, C., Tang, C.P., Chen, T., Weiss, H.C., Gesing, E.R., and Rowland, A., (2008). Antidiabetic activities of triterpenoids isolated from bitter melon associated with activation of the AMPK pathway. Chemistry & Biology, 15: 263-273.

Telang, M., Srinivasan, A., Patankar, A., Harsulkar, A., Joshi, V., Damle, A., Deshpande, V., Sainani, M., Ranjekar, P., and Gupta, G., (2003). Bitter gourd proteinase inhibitors: potential growth inhibitors of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. Phytochemistry, 63: 643-652.

Teoh, Y. P., and Mashitah, M. D. (2016). Extraction of 4h-pyran-4-one, 2, 3-dihydro-6-methyl-, an alternative antifungal agent, from *schizophyllum commune*: optimization and kinetic study. Borneo Science, 37(1): 1-22.

Vikram, A., Prithiviraj, B., Hamzehzarghani, H., and Kushalappa, A., (2004). Volatile metabolite profiling to discriminate diseases of McIntosh apple inoculated with fungal pathogens. Journal of the Science of Food and Agriculture, 84: 1333-1340.

Villarreal-La Torre, V.E., Guarniz, W.S., Silva-Correa, C., Cruzado-Razco, L., Siche, R. (2020). Antimicrobial activity and chemical composition of *Momordica Charantia*: A review. Pharmacognosy Journal,12: 213-222.

Wang, S., Zhang, Y., Liu, H., He, Y., Yan, J., Wu, Z., and Ding, Y., (2012). Molecular cloning and functional analysis of a recombinant ribosome-inactivating protein (alpha-momorcharin) from *Momordica charantia*. Applied Microbiology and Biotechnology, 96: 939-950.

Wang, S., Zheng, Y., Xiang, F., Li, S., and Yang, G., (2016). Antifungal activity of *Momordica charantia* seed extracts toward the pathogenic fungus *Fusarium solani* L. Journal of Food and Drug Analysis, 24: 881-887.

Wightwick, A., Walters, R., Allinson, G., Reichman, S., and Menzies, N., (2010). Environmental risks of fungicides used in horticultural production systems. Fungicides, : 273-304.

Wu, S.J., and Ng, L.T., (2008). Antioxidant and free radical scavenging activities of wild bitter melon (*Momordica charantia* Linn. var. *abbreviata Ser*.) in Taiwan. LWT - Food Science and Technology, 41: 323-330.

Yaldız, G., Sekeroglu, N., Kulak, M., and Demirkol, G., (2014). Antimicrobial activity and agricultural properties of bitter melon (*Momordica charantia* L.) grown in northern parts of Turkey: a case study for adaptation. Natural Product Research, 29: 543-545.

Yangui, T., Sayadi, S., Rhouma, A., and Dhouib, A., (2010). Potential use of hydroxytyrosol-rich extract from *olive mill* wastewater as a biological fungicide against *Botrytis cinerea* in tomato. Journal of pest science, 83: 437-445.

Zhou, L., Zhang, X., Li, C., Christensen, M.J., and Nan, Z., (2015). Antifungal activity and phytochemical investigation of the asexual endophyte of *Epichloë* sp. from *Festuca sinensis*. Science China Life Sciences, 58: 821-826.

Zulbadli, N., Alwi, H., and Hamid, K.H.K. (2011). Momordica charantia extraction by using pressurized boiling system and compounds identification through gas chromatography mass spectrometry. International Journal of Engineering & Technology, 11(3): 79-84.