

ارزیابی اثرهای ضدقارچی عصاره‌های آبی، الکی و استونی گال بلوط ایرانی (*Quercus brantii* Lindl. var.) (*persica* (Jaub and Spach) Zohary

سیده معصومه زمانی^{۱*} و سیدابراهیم صادقی^۲

*۱- نویسنده مسئول، استادیار پژوهش، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

پست الکترونیک: mzamani@rifr-ac.ir

۲- استاد پژوهش، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۱/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۳/۰۷

چکیده

استفاده از عصاره‌ها و اسانس‌های با منشأ گیاهی یکی از روش‌های نوین، سالم و بی‌خطر برای کنترل بیماری‌های گیاهیست. مشخص شده است که ترکیبات استخراج شده از گال بلوط دارای خواص دارویی و درمانی متعدد بوده و دارای خواص ضد میکروبی بالایی نیز هستند. این پژوهش با هدف ارزیابی اثرهای ضدقارچی ترکیبات استخراجی از گال بلوط ایرانی (*Quercus brantii* var.) *persica* ناشی از زنبور *Aphelonyx persica* روی تعدادی از قارچ‌های مهم بیماری‌زای گیاهی (فوزاریوم، آلترناریا، پیتیوم و فیتوفتورا) انجام شد. برای این منظور پس از تهیه عصاره آبی، استونی و متانولی از گال *A. persica* طی آزمون‌های مختلف محیط‌های متناسب آگاردار و مایع دارای غلظت‌های گوناگونی از انواع عصاره‌ها تهیه و میانگین رشد و وزن پرگنه‌های قارچی و نیز اسپورزایی آنها در غلظت‌های متفاوت هر عصاره اندازه‌گیری و با شاهد مقایسه شد. نتایج نشان داد اثر ضدقارچی عصاره‌های گال *A. persica* وابسته به غلظت بوده و همراه با افزایش غلظت عصاره، خاصیت ضدقارچی آنها افزایش می‌یابد. مقایسه میان اثر عصاره‌ها نشان داد اگرچه عصاره‌ها در غلظت‌های مورد استفاده خاصیت ضدقارچی معنی‌داری روی رشد و وزن پرگنه‌های قارچی نداشته است، اما عصاره الکی اسپورزایی قارچ‌ها را مهار کرد. به طوری‌که عصاره الکی در غلظت‌های ۵۰ و ۷۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و بالاتر به طور معنی‌داری موجب کاهش تولید اسپور در محیط‌های کشت قارچی شد؛ از این رو لازم است در مطالعات آینده در زمینه کاربرد دارویی آن تحقیقات جامع‌تری انجام شود.

واژه‌های کلیدی: گال، بلوط ایرانی، خواص ضدقارچی، قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی.

مقدمه

ضروریست (Bernardo et al., 2002). در این بین نقش و اهمیت ترکیبات طبیعی گیاهان در کنترل انواع بیماری‌های گیاهی از جمله بیماری‌های قارچی، باکتریایی، ویروسی و نماتدها بسیار بارز و برجسته است؛ زیرا از یکسو برای تعدادی از عوامل بیماری‌زای خاک‌زاد و بذرزاد روش کنترل مؤثر و پایداری وجود ندارد و از سوی دیگر همانطور که

با توجه به ظهور پدیده مقاومت در قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی نسبت به قارچ‌کش‌های شیمیایی، محدود بودن قارچ‌کش‌های شیمیایی و نیز آثار سوء و زیان‌بار آنها در محیط‌زیست و بهداشت انسانی، تحقیق و پژوهش برای یافتن قارچ‌کش‌های طبیعی با عوارض جانبی کمتر، لازم و

ذکر شد پیدایش پدیده‌های مقاومت به انواع سموم سنتتیک، مسمومیت‌های ناشی از مصرف سموم شیمیایی در جانوران، آبریان و حشرات مفید و نیز اثرهای سوء باقیمانده‌های سموم مشکلات عدیده‌ای را برای سلامت انسان و محیط‌زیست فراهم آورده است (Soković et al., 2013). از این رو بسیاری از کشورها با استفاده از فناوری جدید تهیه و فرمولاسیون سموم غیرشیمیایی از جمله آفت‌کش‌های با پایه و منشأ گیاهی مبادرت به کنترل تلفیقی بیماری‌های مهم گیاهی نموده‌اند (Nikolova et al., 2017). در این میان گال‌های درختان بلوط اهمیت ویژه‌ای دارند. این گال‌ها در واقع ناهنجاری رشدی ایجاد شده توسط گروهی از بندپایان و به‌ویژه حشرات روی اندام‌های مختلف (برگ، ساقه، میوه، شاتن و ریشه) درختان بلوط هستند که در میان آنها زنبورهای خانواده (Cynipidae) جایگاه خاصی دارند (Stone et al., 2002). براساس تحقیقات انجام شده، ۷۸ نوع گال ناشی از فعالیت زنبورهای گالزای این خانواده از روی گونه‌های مختلف بلوط در ایران جمع‌آوری و شناسایی شده است (Sadeghi et al., 2006, 2010).

دیرزمانی است که خواص درمانی بلوط و گال‌های ایجاد شده بر روی آن آشکار شده (Shrestha et al., 2014) و نشان داده شده است که عصاره به‌دست آمده از گال‌های بلوط دارای ترکیبات فنولی مانند تانیک اسید و گالیک اسید است و این ترکیبات دارای اثرهای ضدباکتریایی (Hussein et al., 2000)، ضدویروسی (Fatima et al., 2001)، ضدقارچی (Digrak et al., 1999) و ضد آفات حشره‌ای (Redwane et al., 2002) می‌باشد. البته تاکنون استفاده از گال‌های مختلف در مبارزه با بیمارگرهای گیاهی به‌ویژه باکتری‌ها به‌عنوان یک هدف مهم توسط محققان مختلف دنبال شده است. Digrak همکاران (۱۹۹۹) فعالیت ضد میکروبی عصاره چند گیاه از جمله بلوط *Quercus macrolepis* (Kotschy) Hedge & Yalt. و گال ایجاد شده بر روی آن را علیه قارچ‌های *Penicillium Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. *Fusarium equiseti* (Corda) *italicum* Wehmer

بلوط ایرانی (*Quercus brantii* Lindl. var.) بلوط ایرانی (Zohary *persica* (Jaub and Spach) یا برودار، فراوان‌ترین و گسترده‌ترین گونه بلوط در عرصه زاگرس به‌شمار می‌رود. این گونه از شمال غرب کشور در سردشت و پیرانشهر در استان آذربایجان غربی به‌صورت مخلوط با سایر گونه‌های بلوط تا فیروزآباد فارس به‌صورت توده خالص در عرصه زاگرس پراکنش دارد. از سوی دیگر، گال‌های حاصل از زنبور گالزای *Aphelonyx persica* روی جوانه‌های جانبی و شاخه‌های بلوط ایرانی تشکیل می‌شود که در زبان محلی به آن برامازو گفته می‌شود و فراوانی آن در تمام مناطق پراکنش بلوط ایرانی گزارش شده است (Sadeghi et al., 2010).

با توجه به احتمال وجود برخی ترکیبات ضدقارچی در عصاره استخراج شده از گال‌های ناشی از تغذیه زنبورهای گال‌زا روی درختان بلوط و از آنجایی که مطالعه مشخصی در مورد گال‌های بلوط ایرانی انجام نشده بود، در این مطالعه فعالیت ضدقارچی عصاره آبی، متانولی و استونی این گال‌ها مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت.

و عصاره‌گیری از آنها انجام شود (Basri & Fan, 2005). آنگاه پودر به دست آمده از الک ۰/۵ مش گذرانده شد.

- از پودر به دست آمده، سه مجموعه ۱۰۰ گرمی برداشته شد. برای به دست آوردن عصاره محلول در استون گال‌ها، مقدار ۱۰۰ گرم پودر گال درون ۵۰۰ میلی‌لیتر استون ریخته و به مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه سونیکاتور قرار داده شد. پس از گذشت زمان مربوطه سوسپانسیون توسط کاغذ صافی فیلتر شد (شکل ۱).

- سپس به رسوب به دست آمده ۳۰۰ میلی‌لیتر استون اضافه و دوباره در دستگاه سونیکاتور به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد و بار دیگر توسط کاغذ صافی فیلتر گردید (شکل ۲).

- پس از آن عصاره‌های فیلتر شده حاصل از هر دو مرحله با هم ترکیب و توسط دستگاه تقطیر تغلیظ شد تا حلال استونی کاملاً از آن جدا شود (شکل ۳). در نهایت رسوب خشک (عصاره خشک مواد محلول در استون) به دست آمده برای نگهداری به یخچال منتقل شد.

مواد و روش‌ها

جدایه‌های قارچی: در این مطالعه پرگنه قارچ‌های *Fusarium solani*, *Pythium* sp., *Phytophthora* sp. *Alternaria alternata* (Fr.) و (Mart.) Sacc. Keissl. از دانشگاه تربیت مدرس دریافت و با به‌کارگیری روش نوک‌ریسه نمودن خالص‌سازی شد. سپس از کشت‌های تازه برای بررسی اثر ترکیبات استخراجی گال استفاده شد.

مواد گیاهی: گال‌های *Aphelonyx persica* مورد نیاز از استان کهگیلویه و بویراحمد از درختان بلوط ایرانی جمع‌آوری شد.

عصاره‌گیری از گال‌ها با استفاده از متانول، استون و آب - ابتدا گال‌های جمع‌آوری شده *A. persica* در آزمایشگاه در دستگاه خردکن به خوبی آسیاب شد تا به پودر نرمی تبدیل



شکل ۱- پودر گال پس از قرار گرفتن در حلال و دستگاه سونیکاتور



شکل ۲- عصاره‌های گال فیلتر شده با کاغذ صافی



شکل ۳- جداسازی حلال از عصاره‌های تهیه شده از گال *Aphelonyx persica* و رسوب خشک حاصل

۱- ارزیابی رشد میسلیوم جدایه‌های قارچی در محیط کشت جامد حاوی غلظت‌های مختلف عصاره گال برای آماده کردن محیط‌های کشت جامد حاوی عصاره گال در غلظت‌های موردنظر، ۲۵، ۵۰ و ۷۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از هر یک از عصاره‌های آبی، استونی و الکی گال به صورت استریل به محیط PDA اضافه گردید (Basri & Fan, 2005). به منظور اطمینان از عدم آلودگی، پلیت‌ها به مدت ۳ روز در زیر هود نگهداری و بعد تلقیح شدند. به این ترتیب که از جدایه‌های قارچی محیط کشت ده روزه تهیه و برای تعیین میزان رشد قارچ‌ها در محیط‌های جامد حاوی غلظت‌های مختلف عصاره گال، مقدار مساوی از حاشیه پرگنه در حال رشد جدایه‌ها بریده و با رعایت اصول و شرایط سترون به صورت وارونه به مرکز پتری‌دیش‌های محتوای غلظت‌های مختلف عصاره گال انتقال داده شد. سپس محیط کشت‌های تلقیح شده در انکوباتور در دمای ۲۴ درجه سلسیوس به مدت یک هفته نگهداری شدند. برای هر غلظت و هر جدایه سه تکرار در نظر گرفته شد. دو قطر عمود بر هم پرگنه هر یک از قارچ‌ها در محیط کشت‌های حاوی غلظت‌های مختلف عصاره‌های گال در هر تکرار بعد از یک هفته اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری بر حسب میلی‌متر انجام و میانگین‌ها و اعداد مربوطه برای هر جدایه محاسبه و ثبت شد. برای محاسبه میزان رشد میسلیوم، اندازه قطر دیسک‌های اولیه که روی محیط‌های کشت قرار داده شده بودند از اندازه قطر پرگنه کم شد. بر این اساس، میزان

برای به دست آوردن عصاره محلول در الکل گال‌ها، دقیقاً طبق روش ذکر شده در مورد حلال استونی عمل شد، یعنی فقط به جای استون از متانول استفاده شد. - برای استخراج عصاره محلول در آب گال‌ها نیز همانند روش مذکور عمل شد، با این تفاوت که در مرحله نهایی به منظور تبخیر نمودن آب، به جای استفاده از دستگاه تقطیر، عصاره به دست آمده درون آن ۵۰ درجه سلسیوس به مدت دو روز قرار داده شد تا آب آن کاملاً تبخیر گردد و رسوب خشک به دست آید. بررسی اثر غلظت‌های مختلف عصاره گال در جلوگیری از رشد و اسپورزایی جدایه‌های قارچی این آزمایش‌ها در قالب آزمایش فاکتوریل با طرح کاملاً تصادفی انجام شد. در این آزمون‌ها برای همه تیمارها سه تکرار در نظر گرفته شد و فاکتورهای مورد بررسی عبارت بودند از: ۱- نوع عصاره گال (شامل سه سطح یعنی عصاره آبی، الکی و استونی)، ۲- غلظت‌های مختلف (شامل سه سطح که شامل غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۷۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و غلظت صفر که همان تیمار شاهد بوده و در حقیقت محیط کشت‌های فاقد عصاره گال در نظر گرفته شد و برای تبدیل اندازه رشد جدایه‌ها به درصد بازدارندگی استفاده شد) و جدایه‌های قارچ (شامل چهار جدایه پیتیوم، فیتوفتورا، فوزاریوم و آلترناریا) بودند. آزمایش‌ها در دو گروه شامل ارزیابی در محیط کشت جامد و ارزیابی در محیط کشت مایع انجام شد.

غلظت‌های مختلف عصاره گال تلقیح شد. فلاسک‌ها به مدت ۱۴ روز روی دستگاه شیکر با دور ۸۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. برای هر غلظت و هر جدایه سه تکرار در نظر گرفته شد. پس از این مدت، با استفاده از پمپ خلأ، قیف بوختر و کاغذ صافی سترون‌شده محیط مایع حاوی کنیدی‌های قارچ از میسلیم آن جدا گردید. میسلیم‌های به‌دست آمده از هریک از تیمارها را با آب‌مقطر استریل شسته و پس از خشک کردن کامل آن با استفاده از کاغذ صافی، روی ترازو قرار داده شد تا وزن آن تعیین و ثبت گردد.

۳- ارزیابی تولید اسپور جدایه‌های قارچی در محیط کشت مایع حاوی غلظت‌های مختلف عصاره گال
در مورد دو قارچ فوزاریوم و آلترناریا، هریک از محیط‌های مایع حاوی کنیدی‌های قارچ که در آزمایش قبل در ظرف استریل زیر قیف جمع‌آوری شده بودند، دو مرتبه و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۳۰۰۰ سانتریفیوژ، در مرحله اول، بعد از سانتریفیوژ، مایع داخل لوله سانتریفیوژ دور ریخته شد و رسوب حاصل از آن در ته لوله سانتریفیوژ، با مقداری آب‌مقطر استریل کاملاً مخلوط و بعد از حصول اطمینان از اختلاط آنها برای بار دوم سانتریفیوژ گردید. دوباره رسوب ته لوله سانتریفیوژ با ۱۰ میلی‌لیتر آب‌مقطر مخلوط و معلق شد. برای شمارش اسپور با لام گلبول‌شمار از این سوسپانسیون یک میلی‌لیتر برداشته و از آن سریال رقت تهیه شد. از آنجایی‌که رسوب اسپور قارچ در ۱۰ میلی‌لیتر آب‌مقطر استریل سوسپانسیون شده بود، در نتیجه نحوه محاسبه تعداد اسپور نهایی به شرح زیر انجام شد.

$$۱۰ \times \text{میانگین تعداد اسپور شمارش شده در تکرارهای هر تیمار} \times ۱۰^۴ \times \text{تعداد رقت} ۱۰$$

چند دامنه‌ای دانکن و آنالیز واریانس چند طرفه انجام گردید. ملاک معنی‌دار بودن ($P \geq 0.01$) در نظر گرفته شد.

رشد میسلیم جدایه‌های مختلف قارچی در همه غلظت‌های یادشده عصاره گال به‌دست آمد.

۲- ارزیابی وزن میسلیم جدایه‌های قارچی در محیط کشت مایع حاوی غلظت‌های مختلف عصاره گال
برای ارزیابی وزن خشک میسلیم تولید شده قارچ‌ها از محیط مایع عصاره سیب‌زمینی - دکستروز استفاده شد. برای تهیه محیط‌های کشت مایع، ۲۰۰ گرم سیب‌زمینی در یک لیتر آب به مدت نیم ساعت جوشانیده، سپس مایع جوشانیده شده از پارچه ملامل عبور داده شد. پس از آن به این مایع ۱۰ گرم دکستروز افزوده و حجم نهایی محلول با آب‌مقطر به یک لیتر رسانده شد. محیط‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سیلسیوس اتوکلاو گردیدند. پس از اتوکلاو شدن و رسیدن دمای محیط کشت به ۵۰ درجه سیلسیوس، برای جلوگیری از رشد باکتری‌ها آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین به میزان ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر به هریک از محیط‌ها افزوده شد. سپس غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۷۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از هریک از عصاره‌های آبی، استونی و الکلی گال به‌طور مجزا و به‌صورت استریل به محیط‌ها اضافه شد. ارن‌ها به مدت ۳ روز در زیر هود نگهداری و بعد تلقیح شدند.

به‌منظور انتقال جدایه‌های قارچی به محیط‌های کشت مایع حاوی عصاره گال، ابتدا یک کشت جدید از تمام جدایه‌های قارچی در محیط PDA تهیه شد و بعد پلیت‌ها به مدت ده روز در دمای ۲۴ درجه سیلسیوس در تاریکی نگهداری شدند. پس از رشد، یک دیسک با ابعاد مساوی از حاشیه فعال پرگنه‌های ده روزه قارچ‌های آلترناریا، فوزاریوم، پیتیوم و فیتوفترا برداشته و به‌طور مجزا در شرایط سترون به فلاسک‌های حاوی محیط کشت مایع دارای

نتایج آماری با استفاده از آزمون تجزیه واریانس چند طرفه بررسی شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS استفاده شد. همچنین مقایسه میانگین‌ها با آزمون

نتایج

۱- ارزیابی رشد میسلیموم جدایه‌های قارچی در محیط کشت جامد حاوی غلظت‌های مختلف عصاره گال نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به تأثیر عصاره‌های مختلف گال روی رشد میسلیموم جدایه‌های

قارچی نشان داد که دوزهای به‌کار برده شده برای هر سه نوع عصاره الکلی، آبی و استونی به‌دست آمده از گال *Aphelonyx persica* اثر ضدقارچی معنی‌دار و ممانعت‌کنندگی از رشد میسلیموم قارچی نداشته‌اند (جدول ۱).

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس رشد میسلیموم جدایه‌های قارچی در محیط کشت جامد حاوی غلظت‌های مختلف از انواع عصاره گال

<i>Aphelonyx persica</i>				
نوع عصاره	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		پیتیموم	فیتوفتورا	فوزاریوم
عصاره آبی	۳	۰/۶۰۲ ns	۰/۷۸۴ ns	۰/۳۶۷ ns
عصاره استونی	۳	۰/۳۸۶ ns	۰/۲۷۴ ns	۰/۱۴۵ ns
عصاره الکلی	۳	۰/۵۷۱ ns	۰/۱۸۰ ns	۰/۲۱۸ ns

ns=عدم معنی‌دار

بنابراین به دلیل معنی‌دار نبودن تفاوت میزان رشد قارچ‌ها در تیمارهای به‌کار برده شده، انجام تجزیه و تحلیل‌های آماری به منظور سطح‌بندی میانگین داده‌ها به روش آزمون دانکن امکان‌پذیر نبود.

دوزهای مورد استفاده، تأثیر معنی‌داری روی پراوری پرگنه و وزن میسلیموم قارچ‌ها نداشته‌اند (جدول ۲). نظر به اینکه نتایج حاصل از بررسی وزن میسلیموم قارچ‌ها نیز نشان داد که عصاره‌های استخراج شده از گال *A. persica* برای هر سه نوع عصاره الکلی، آبی و استونی در تمام دوزهای به‌کار برده شده اثر ضد قارچی معنی‌داری نداشته است؛ البته سطح‌بندی میانگین داده‌ها به روش آزمون دانکن میسر نبود.

۲- ارزیابی وزن میسلیموم جدایه‌های قارچی در محیط کشت مایع حاوی غلظت‌های مختلف عصاره گال نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که هیچ‌یک از عصاره‌های الکلی، آبی یا استونی گال *A. persica* در

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس وزن میسلیموم جدایه‌های قارچی در محیط کشت مایع حاوی غلظت‌های مختلف از انواع عصاره گال

<i>Aphelonyx persica</i>				
نوع عصاره	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		پیتیموم	فیتوفتورا	فوزاریوم
عصاره آبی	۳	۰/۰۲۴ ns	۰/۰۱۷ ns	۰/۰۱۸ ns
عصاره استونی	۳	۰/۰۲۲ ns	۰/۰۰۱ ns	۰/۰۱۲ ns
عصاره الکلی	۳	۰/۰۱۵ ns	۰/۰۰۱ ns	۰/۰۲۷ ns

ns=عدم معنی‌دار

قارچ آلترناریا و فوزاریوم نسبت به شاهد شده است؛ درحالی که افزودن عصاره های آبی یا استونی در دوزهای مورد استفاده، تأثیر معنی داری روی تولید اسپور قارچها نداشت (جدول ۳).

۳- ارزیابی تولید اسپور جدایه های قارچی در محیط کشت مایع حاوی غلظت های مختلف عصاره گال پس از تجزیه آماری نتایج این آزمون مشخص کرد که اضافه نمودن عصاره متانولی گال *A. persica* به محیط کشت موجب تغییر معنی دار در میزان تولید اسپور توسط

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس میزان تولید اسپور توسط قارچ های آلترناریا و فوزاریوم در محیط کشت مایع حاوی غلظت های مختلف

از انواع عصاره گال *Aphelonyx persica*

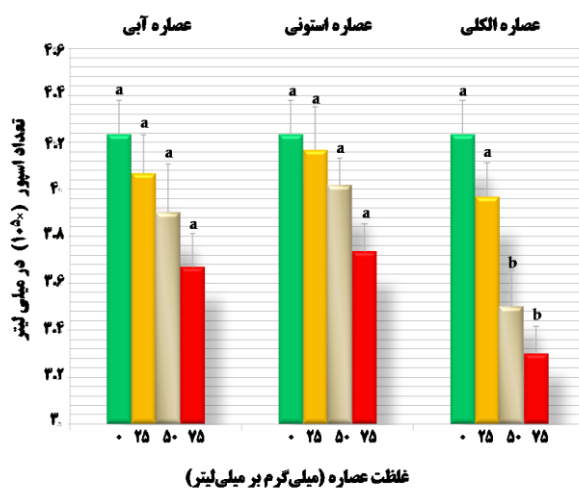
میانگین مربعات		درجه آزادی	نوع عصاره
آلترناریا	فوزاریوم		
۰/۱۲۳ ns	۰/۱۷۶ ns	۳	عصاره آبی
۰/۱۴۱ ns	۰/۱۴۸ ns	۳	عصاره استونی
۰/۴۲۸ ★★	۰/۵۴۶ ★★	۳	عصاره الکلی

★★ در سطح ۰/۰۱ درصد معنی دار

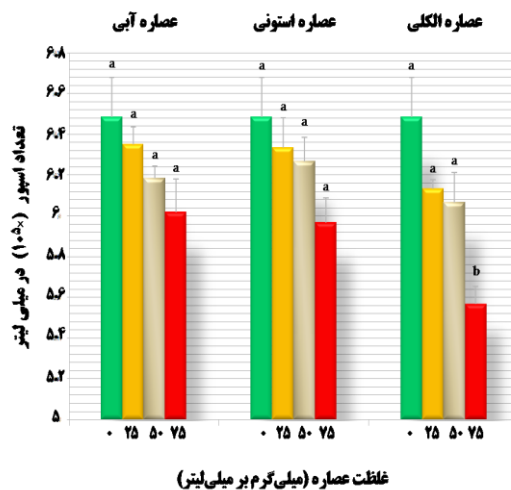
ns = عدم معنی دار

و به میزان ۷۰ میلی گرم / میلی لیتر به محیط کشت قارچ آلترناریا (شکل ۵)، به طور معنی داری موجب کاهش تولید اسپور در محیط های کشت مایع شد.

مقایسه میانگین داده ها به روش آزمون دانکن نشان داد که اضافه نمودن عصاره متانولی گال به میزان ۵۰ و ۷۰ میلی گرم / میلی لیتر به محیط کشت قارچ فوزاریوم (شکل ۴)



شکل ۴- مقایسه میانگین میزان تولید اسپور توسط قارچ فوزاریوم در محیط کشت مایع حاوی غلظت های مختلف از انواع عصاره گال *Aphelonyx persica* توسط آزمون دانکن



شکل ۵- مقایسه میانگین میزان تولید اسپور توسط قارچ آلترناریا در محیط کشت مایع حاوی غلظت‌های مختلف از انواع عصاره گال *Aphelonyx persica* توسط آزمون دانکن

اما در مواقع بروز شرایط نامساعد، بسیاری از قارچ‌ها تولید اسپورهای غیرجنسی را کاهش داده و به جای آن اسپورهای جنسی مقاوم یا اسپورهای غیرفعال تولید می‌کنند. از این رو ممکن است کاهش تولید اسپور غیرجنسی قارچ‌های آلترناریا و فوزاریوم در محیط‌های کشت حاوی غلظت‌های بالای عصاره گال مربوط به نامساعد شدن شرایط کشت برای آنها باشد.

گزارش شده است که گال‌های بلوط دارای تانن می‌باشند. میزان تانن موجود در گال‌های مازوج سبز، مازوج سفید یا زرد، خرنوک، قشکای علفی، سیچکا، قلقاف، ستاره‌ای و تیغی به ترتیب برابر با ۵۲، ۵۱، ۴۸، ۳۱، ۳۰، ۲۶، ۲۵ و ۱۶ درصد گزارش شده است (Sadeghi et al., 2010). از سوی دیگر مشخص شده است که تانن موجود در عصاره‌های گیاهی دارای فعالیت ضد میکروبی هستند و متانول مؤثرترین حلال برای استخراج ترکیبات تانن از گیاهان است (Ding et al., 2017). بنابراین می‌توان خاصیت نامساعد نمودن محیط کشت برای تولید اسپور قارچی توسط عصاره گال را به وجود ترکیبات تانن موجود در این عصاره (به‌ویژه عصاره متانولی) نسبت داد، زیرا همان‌گونه که ذکر شد تانن‌ها از ترکیبات مهم در درختان

بحث

با توجه به اینکه درخت بلوط ایرانی گال‌های منحصر به فردی دارد که تاکنون مطالعه چندانی در مورد خاصیت ضد میکروبی آن به تفکیک و با توجه به نوع گال ایجاد شده انجام نشده بود، تحقیق در این زمینه مناسب و کاربردی به نظر می‌رسید. از این رو، این پژوهش با هدف ارزیابی اثرهای ضدقارچی ترکیبات استخراجی از گال بلوط ایرانی روی تعدادی از قارچ‌های مهم بیماری‌زای گیاهی انجام شد.

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد، اگرچه عصاره‌های الکی، آبی یا استونی گال *A. persica* در دوزهای مورد استفاده تأثیر معنی‌داری روی رشد و وزن میسلیم قارچ‌ها نداشته‌اند؛ اما عصاره متانولی این گال در غلظت ۷۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در قارچ آلترناریا و در غلظت ۵۰ و ۷۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در قارچ فوزاریوم به‌طور معنی‌داری از تولید اسپور قارچ جلوگیری کرد.

قارچ‌ها در شرایط مطلوب اسپورزایی زیادی داشته و در این شرایط به سهولت تولید اسپورهای غیرجنسی فراوانی می‌نمایند که این اسپورها واحدهای اصلی ایجادکننده آلودگی محسوب شده و می‌توانند سبب شیوع قارچ گردند.

A. پژوهش مشاهده گردید اگرچه تأثیر عصاره گال *persica* در دوزهای مورد استفاده روی پرآوری و رشد میسلیم قارچها معنی دار نبود؛ اما افزایش غلظت عصاره گال در محیطهای کشت موجب کاهش رشد قارچها می گردد. به طوری که با مطالعه Safary و همکاران (۲۰۰۹) که بر روی اثر آنتی باکتریال بلوط *Quercus brantii* علیه ۸ باکتری بیمارگر انجام شد و افزایش قطر هاله بازدارندگی رشد متناسب با افزایش غلظت عصاره متانولی بلوط بود، همخوانی دارد. در مطالعه‌ای تحت عنوان ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی عصاره هیدروالکلی میوه بلوط به روش انتشار دیسک توسط Ebrahimi و همکاران (۲۰۱۰)، نشان داده شده است که بلوط ایرانی دارای ترکیباتی با خصوصیات ضدباکتریایی است و اثر عصاره بر روی باکتری وابسته به غلظت مواد ضد میکروبی آن بوده و همراه با افزایش غلظت عصاره قطر هاله عدم رشد اطراف باکتری نیز افزایش یافته است. در نتایج مطالعه Sharifi و همکاران (۲۰۱۲) نیز اثر ضدقارچی عصاره میوه بلوط *Q. persica* علیه ساپروولگنیا وابسته به غلظت بوده و همراه با افزایش غلظت عصاره، خاصیت ضدقارچی آن افزایش یافت.

در مطالعه دیگری که در مورد نقش عصاره متانولی برگ گیاه بلوط به روش انتشار دیسک روی تعدادی از باکتریها انجام شد، قطر هاله عدم رشد بعد از ۲۴ ساعت اندازه‌گیری مشخص کرد که در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و بالاتر، این عصاره روی تعدادی از میکروارگانیسمها مؤثر بود (Kharazmi et al., 2009). در تحقیقی که توسط Karimi و همکاران (۲۰۱۱) با بررسی اثر غلظت‌های مختلف عصاره بلوط ایرانی بر مراحل قبل و بعد از اتصال ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ به سلول هدف و همچنین بررسی غلظت سمیت آن بر سلول هدف انجام شده، اعلام شده است که این عصاره در غلظت ۱/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در قبل از اتصال ویروس به سلول مؤثر بوده اما در این محدوده از غلظت سمیتی برای سلول نداشته است. در مطالعه Ghasemi Pirbalouti و همکاران (۲۰۱۲) اثر ضد میکروبی عصاره *Q. branti* به روش دیسک دیفیوژن

بلوط هستند. تانن از واژه کهن Tanning گرفته شده است که منعکس‌کننده یک تکنولوژی سنتی عایق و حفظ کردن می‌باشد و از آن برای توصیف روند تبدیل پوست حیوانی به چرم با استفاده از عصاره‌های گیاهی که از قسمت‌های مختلف گونه‌های گیاهی متفاوت به دست می‌آورند، استفاده می‌کردند (McGee, 2004). تانن در قسمت‌های مختلف گیاه مانند پوست درخت، چوب، میوه، برگ، ریشه و گال در برخی گونه‌های گیاهی مانند گونه‌هایی از بلوط، اکالیپتوس، توس، بید و کاج گزارش شده است (Giner-Chavez, 1996). تاننها متشکل از گروه بسیار متنوعی از پلیمرها هستند که جزو ترکیبات فنلی دسته‌بندی شده‌اند (Skocibusic et al., 2006). ارزش دارویی تانن به عنوان آنتی‌بیوتیک و اثر ضدسرطانی آن توسط دانشمندان مختلف و در پژوهش‌های متعددی بررسی شده است که از جمله می‌توان به اثر ضدقارچی آنها اشاره نمود. تاننها می‌توانند برای باکتری‌ها، مخمرها و قارچ‌های رشته‌ای و حتی ویروس‌ها سمی باشند. تاننها با رسوب پروتئین‌های میکروبی مانع از رشد و تکثیر آنها می‌شوند. تاننها می‌توانند باعث شوند که پروتئین‌های غذایی در دسترس میکروب‌ها قرار نگیرند، یا از طریق سازوکار به دام انداختن آهن، باند شدن هیدروژن و پراکنش اختصاصی با پروتئین‌های حیاتی مانند آنزیم‌ها ایفای نقش کنند. تاننها حتی قادرند با مهار آنزیم ترانس کریپتاز معکوس در ویروس‌های انسانی مانع از تکثیر آنزیم آنها شوند (Mueller-Harvey et al., 2019).

همسو با نتایج این پژوهش، نتایج حاصل از تحقیق Borjian Brojeni و همکاران (۲۰۱۶) نشان داد که عصاره بلوط ایرانی با دارا بودن مقادیر کافی تانن و مشتقات مربوطه، در شرایط آزمایشگاهی اثرهای ضد میکروبی داشته است. از آنجایی که تانن از مهمترین مواد مؤثره این گیاه و گال‌های آن با اثرهای قابض و ضد عفونی‌کننده است، به نظر می‌رسد که میزان خاصیت ضد میکروبی انواع بلوط به مقدار تانن موجود در عصاره‌های گیاه بستگی داشته باشد و همراه با افزایش غلظت عصاره، خاصیت ضدقارچی آن افزایش می‌یابد. در همین راستا، براساس نتایج آزمون‌های این

این زمینه روی سایر گال‌های درختان بلوط انجام و خواص ضدقارچی آن‌ها نیز ارزیابی شود.

منابع مورد استفاده

- Basri, D.F. and Fan, S.H. 2005. The potential of aqueous and acetone extracts of galls of *Quercus infectoria* as antibacterial agents. *Indian Journal of Pharmacology*, 37(1): 26-29.
- Bernardo, D., Novaes-Ledieu, M., Perez Cabo, A., Gea Alegria, F. J. and Garcia Mendoza, C. 2002. Effect of the fungicide Prochloraz-Mn on the cell wall structure of *Verticillium fungicola*. *International Microbiology*, 5: 121-125.
- Borjian Brojeni, S., Kaveh baba heydari, E., Mortezaei, S., Borjian Brojeni, M. and Validi, M. 2016. Study antibacterial effects of hydroalcoholic extract of acorn fruit's (*Quercus branti*) against *Listeria monocytogenes* and *Enterococcus faecalis* in vitro. *Journal of Shahrekord University of Medical Sciences*, 17(6): 98-106 (In Persian).
- Digrak, M., Alma, M.H., Ilcim, A. and Sen, S. 1999. Antibacterial and antifungal effects of various commercial plant extracts. *Pharmaceutical Biology*, 37(3): 216-220.
- Ding, T., Bianchi, S., Ganne-Chédeville, C., Kilpeläinen, P., Haapala, A. and Rätty, T. 2017. Life cycle assessment of tannin extraction from spruce bark. *iForest*, 10(5): 807-814.
- Ebrahimi, A., Khayami, M. and Nejati, V. 2010. Evaluation of the Antibacterial Activity of *Quercus persica* Jaub & Spach Fruit's Hydroalcoholic Extract in Disc Diffusion Method. *Journal of Medicinal Plant*, 1(33): 26-34 (In Persian).
- Fatima, S., Farooqi, A.H.A., Kumar, R., Kumar, T.R.S. and Khanuja, S.P.S. 2001. Antibacterial activity possessed by medicinal plants used in tooth powders. *Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 22: 187-9.
- Ghasemi Pirbalouti, A., Malekpoor, F. and Hamedi, B. 2012. Ethnobotany and antimicrobial activity of medicinal plants of Bakhtiari Zagross mountains, Iran. *Journal of medicinal plant research*, 6(5): 675-9.
- Giner-Chavez, B.I. 1996. Condensed tannins in tropical forages. Ph.D. Thesis. Cornell University, Ithaca, NY, USA.
- Hussein, G., Miyashiro, H., Nakamura, N., Hattori, M., Kakiuchi, N. and Shimotohno, K. 2000. Inhibitory effects of Sudanese medicinal plant extracts on hepatitis C virus protease. *Phytotherapy Research*, 14:510-6.
- Karimi, A., Moradi, M., Saedi, M., Salimzadeh, L. and Rafieian, M. 2011. The Inhibitory Effect of *Quercus Persica* L Extract on Herpes Simplex

روی تعدادی از باکتری‌ها بررسی شد، ولی اثر ضدباکتریایی مشاهده نشد. با توجه به موارد ذکر شده و نتایج حاصل از این تحقیق می‌توان نتیجه‌گیری کرد که عصاره‌های گال (*Aphelonyx persica* Melika) (به‌ویژه عصاره الکلی آن) روی بلوط ایرانی همانند تأثیر بر سایر میکروارگانیسم‌ها و حتی ویروس‌ها، دارای اثر بازدارندگی رشد و همچنین اثر ممانعت از اسپورزایی قارچ می‌باشد؛ اما احتمالاً به علت تفاوت ساختار تشریحی و فیزیولوژیک میکروارگانیسم‌های مختلف، میزان حداقل غلظت بازدارندگی رشد این عصاره همانند تفاوت تأثیر سموم شیمیایی بر میکروارگانیسم‌های مختلف، بر روی قارچ‌های مورد بررسی در این تحقیق نیز متفاوت بوده است. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که نوع حلال در استخراج متابولیت‌های فعال گال گیاهی مؤثر است و عصاره به‌دست آمده در حلال‌های مختلف می‌تواند اثرهای متفاوتی در کنترل بیمارگرهای گیاهی داشته باشد. در مجموع این نتایج به همراه تحقیقات بیشتر در این زمینه می‌تواند منجر به پیدایش دارو (ها)ی گیاهی ضدقارچی مناسبی شود و استفاده از سموم ضدقارچی سنتزی را به دلیل سمیت و عوارض جانبی ناشی از آنها کاهش دهد.

اگرچه در حال حاضر فراورده‌های مختلف بیولوژیک به‌طور گسترده‌ای برای کنترل آفات و بیماری‌های گیاهی مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد، ولی کاربرد اسانس‌ها و عصاره‌های استخراج شده از گال‌ها در مراحل اولیه تحقیق مورد بررسی قرار گرفته و دانش ما در این زمینه محدود است. انجام مطالعات گسترده در این زمینه راهی برای دستیابی به روش‌های جدیدتر و ایمن‌تر به‌منظور کنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی خواهد بود. از سوی دیگر طبیعت ایران دارای انواع مختلفی از گونه‌های بلوط می‌باشد که گال‌های ایجاد شده روی آنها با توجه به نوع زنبور، از نظر شکل، اندازه و ترکیبات تشکیل‌دهنده با گال‌های ایجاد شده در کشورهای دیگر یا حتی در مناطق مختلف یک کشور اختلافات چشمگیری دارد. بر همین اساس ممکن است خواص دارویی متفاوتی نیز داشته باشند (Sadeghi *et al.*, 2006, 2010). از این رو توصیه می‌شود تحقیقات دیگری در

- Sadeghi, S.E., Melika, G., Pujade-Villar, J., Penzes, Z.S., Acs, Z., Bechtold, M., Assareh, M. H., Tavakoli, M., Yarmand, H., Askary, H., Stone, G. N., Azizkhani, E., Zargarani, M.R., Aligholizade, D., Barimani H. and Dordaei. A.A. 2006. Oak cynipid gall inquiline of Iran (Hym.: Cynipidae: Synergini), with description of new species. Journal of Entomological Society of Iran, 25(2): 15-50.
- Safary, A., Motamedi, H., Maleki, S. and Seyyednejad, S.M. 2009. A Preliminary Study on the Antibacterial Activity of *Quercus brantii* Against Bacterial Pathogens. Particularly Enteric Pathogens. International Journal of Botany, 5(2): 176 -80.
- Sharifi, A., Gorjipoura, A., Sardari, M., Mohammadi, R. and Jabarneyad, A. 2012. Antifungal effect of *Quercus infectoria* gall on *Saprolegnia* fungi. Armaghane Danesh, 17(1): 78-84 (In Persian).
- Shrestha, S., Kaushik, V.S., Eshwarappa, R.S.B., Subaramaiha, S.R., Ramanna, L.M. and Lakkappa, D.B. 2014. Pharmacognostic studies of insect gall of *Quercus infectoria* Olivier (Fagaceae). Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 4(1): 35-39.
- Skocibusic, M., Bezic, N. and Dunkic, V. 2006. Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from *Satureja subspicata* Vis. growing in Croatia. Food Chemistry, 96: 20-28.
- Soković, M.D., Glamočlija, J.M. and Ćirić, A.D. 2013. Natural products from plants and fungi as fungicides: 185-232. In: Mizuho, N. (Ed.). Fungicides - Showcases of Integrated Plant Disease Management from Around the World. InTech, Rijeka Croatia.
- Stone, G.N., Schonrogge, K., Atkinson, R.J., Bellido, D. and Villar, J. 2002. The population biology of oak gall wasps (Hymenoptera: Cynipidae). Annual Review of Entomology, 47: 633-668.
- Virus-1 Replication on Baby Hamster Kidney Cells. Armaghane danesh, 16(2):141-149 (In Persian).
- Kharazmi, L., Mrouh, M. and Daher, C. 2009. The role of methanolic extract of *Quercus infectoria* bark in lipemia & glysema & gastric ulcer & bacterial growth. The Journal of Medical Research, 2(4): 224-30.
- McGee, H. 2004. On Food and Cooking. Scribner, New York, 896p.
- Mueller-Harvey, I., Bee, G., Dohme-Meier, F., Hoste, H., Karonen, M., Kölliker, R., Lüscher, A., Niderkorn, V., Pellikaan, W.F., Salminen, J., Skøt, L., Smith, L.M.J., Thamsborg, S.M., Totterdell, P., Wilkinson, I., Williams, A.R., Azuhwi, B.N., Baert, N., Brinkhaus, A.G., Copani, G., Desruets, O., Drake, C., Engström, M., Fryganas, C., Girard, M., Huyen, N.T., Kempf, K., Malisch, C., Mora-Ortiz, M., Quijada, J., Ramsay, A., Ropiak, H.M. and Waghorn, G.C. 2019. Benefits of Condensed Tannins in Forage Legumes Fed to Ruminants: Importance of Structure, Concentration, and Diet Composition. Crop Science, 59: 1-25.
- Nagesh, L., Shayam, S., Muralikrishna, K.S. and Kishore, G. 2012. Antibacterial potential of gall extract *Quercus infectoria* against *Enterococcus faecalis* an in vitro study. Pharmacognosy Journal, 30(9): 28-34.
- Nikolova, M., Yordanov, P., Slavov, S. and Berkov, S. 2017. Antifungal activity of plant extracts against phytopathogenic fungi. Journal of Bioscience and Biotechnology, 6(2): 155-161.
- Redwane, A., Lazrek, H.B., Bouallam, S., Markouk, M., Amarouch, H. and Jana, M. 2002. Larvicidal activity of extracts from *Quercus lusitania* var. *infectoria* galls (Oliv.). Journal of Ethnopharmacology, 79: 261-3.
- Sadeghi, S.E., Assareh, M.H. and Tavakoli, M. 2010. Oak Gall Wasps of Iran. Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, 310p (In Persian).

Evaluation antifungal properties of aqueous, acetone and alcohole extracts of *Quercus brantii* Lindl. var. *persica* (Jaub and Spach) Zohary

S. M. Zamani^{1*} and S.E. Sadeghi²

1* - Corresponding author, Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran Email: mzamani@rifr-ac.ir

2- Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

Received: 16.02.2019

Accepted: 28.05.2019

Abstract

One of the new and safe methods for controlling plant diseases is the use of herbal essences and extracts. It has been determined that the extracts from oak galls have multiple medicinal and therapeutic properties and also have high antimicrobial properties. The present investigation aimed to evaluate the antifungal activities of compounds extracted from oak (*Quercus brantii* var. *persica*) gall formed by *Aphelonyx persica* wasp against a number of important phytopathogenic fungi (*Phytophthora*, *Pythium*, *Fusarium* and *Alternaria*). After preparation of the aqueous, acetone and methanol extracts of *A. persica* galls, in different assays, the appropriate agar and liquid media containing various concentrations of extracts were prepared and weight average, growth and sporulation of fungal colonies were evaluated and then compared with the controls. Findings of this study demonstrated that the antifungal properties of the *A. persica* gall extract were concentration-dependent where its antifungal effect was increased with increasing the extract concentration. The data analysis revealed that none of the gall extracts concentrations significantly affected the growth and weight of fungal colonies, while the alcoholic extract in high doses (50 and 70 mg/ml) inhibited sporulation significantly; therefore, more comprehensive research is needed in future studies on its drug use.

Key words: Antifungal effects, Gall, Phytopathogenic fungi, *Quercus brantii* var. *persica*.