نشریه علمی تحقیقات حمایت و حفاظت جنگلها و مراتع ایران شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijfrpr.2019.125323.1371
جلد ۱۷ شماره ۲، صفحه ۱۷۲-۱۶۱، (۱۳۹۸) شناسه دیجیتال (DOR): 98.1000/1735-0859.1398.17.161.34.2.1575.41

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

سیده‌معصومه زمانی[1*] و سیدابراهیم صادقی[2]

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 ضدمیکروبی 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 الکلی اسپورزایی قارچ‌ها را مهار کرد. به‌طوری‌که عصاره الکلی در غلظت‌های ۵۰ و ۷۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و بالاتر به‌طور معنی‌داری موجب کاهش تولید اسپور در محیط‌های کشت قارچی شد؛ ازاین‌رو 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

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 ضروریست (Bernardo *et al.*, 2002). در این بین نقش و اهمیت ترکیبات طبیعی گیاهان در کنترل انواع بیماری‌های گیاهی ازجمله 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 ذکر

شد پیدایش پدیده‌های مقاومت به انواع سموم سنتتیک، مسمومیت‌های ناشی از مصرف سموم شیمیایی در جانوران، آبزیان و حشرات مفید و نیز اثرهای سوء باقیمانده‌های سموم مشکلات عدیده‌ای را برای سلامت انسان و محیط‌زیست فراهم آورده است (Soković *et al.*, 2013). ازاین‌رو بسیاری از کشورها با استفاده از فناوری جدید تهیه و فرمولاسیون سموم غیرشیمیایی ازجمله 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 درواقع 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 و همکاران (۱۹۹۹) فعالیت ضدمیکروبی عصاره چند گیاه ازجمله بلوط *Quercus macrolepis* (Kotschy) Hedge & Yalt. و گال ایجاد شده بر روی آن را علیه قارچ‌های *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl.، *Penicillium italicum* Wehmer و *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc. *Candida albicans* Logan McCool ارزیابی کردند. نتایج این بررسی نشان داد که عصاره گیاه بلوط و گال ایجاد شده بر روی آن به‌دلیل مقادیر بالای تانن از بالاترین خواص ضدقارچی برخوردار بودند. Basri و Fan (۲۰۰۵)، اثر ضدباکتریایی عصاره‌های آبی و استونی گال‌های *Q. infectoria* را بر تعدادی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بررسی کردند. در میان باکتری‌های آزمایش شده *Staphylococcus aureus* حساس‌ترین باکتری نسبت به عصاره‌ها بود. عصاره‌ها روی سایر گونه‌ها تأثیر پایین‌تری داشتند، اما *Escherichia coli* هیچ حساسیتی نشان نداد. Nagesh و همکاران (۲۰۱۲)، اثر عصاره متانولی گال‌های *Q. infectoria* را بر *Enterococcus faecalis* بررسی نمودند. نتایج آنان نشان داد که عصاره متانولی اثر ضدباکتریایی بالایی علیه *انتروکوکوس فکالیس* دارد.

بلوط ایرانی (*Quercus brantii* Lindl. var. *persica* (Jaub and Spach) Zohary) یا برودار، فراوان‌ترین و گسترده‌ترین گونه بلوط در عرصه زاگرس به‌شمار می‌رود. این گونه از شمال‌غرب کشور در سردشت و پیرانشهر در استان آذربایجان‌غربی 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* Melika, Stone, Sadeghi & Pujade-Villar 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 ازآنجایی‌که 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.

مواد و روش‌ها

جدایه‌های قارچی: در این مطالعه پرگنه قارچ‌های *Phytophthora* sp.، *Pythium* sp.، *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. و *Alternaria alternata* (Fr.) 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* موردنیاز 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 به‌خوبی آسیاب شد تا به پودر نرمی تبدیل و عصاره‌گیری از آنها انجام شود (Basri & Fan, 2005). آنگاه پودر به‌دست آمده از الک ۰/۵ مش گذرانده شد.

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

–سپس به رسوب به‌دست 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 فیلترشده حاصل از هر دو مرحله با هم ترکیب و توسط دستگاه تقطیر تغلیظ شد تا حلال استونی کاملاً از آن جدا شود (شکل ۳). درنهایت رسوب خشک (عصاره خشک مواد محلول در استون) به‌دست آمده برای نگهداری به یخچال منتقل شد.

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

شکل ۲– عصاره‌های گال فیلترشده با کاغذ صافی

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

برای به‌دست آوردن عصاره محلول در الکل گال‌ها، دقیقاً طبق روش ذکر شده در مورد حلال استونی عمل شد، یعنی فقط به‌جای 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 به‌منظور تبخیر نمودن آب، به‌جای استفاده از دستگاه تقطیر، عصاره به‌دست آمده درون آون ۵۰ درجه سیلسیوس به مدت دو روز قرار داده شد تا آب آن کاملاً تبخیر گردد و رسوب خشک به‌دست 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، الکلی 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.

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 هریک از عصاره‌های آبی، استونی و الکلی گال به‌صورت استریل به محیط PDA اضافه گردید (Basri & Fan, 2005). به‌منظور اطمینان از عدم آلودگی، پلیت‌ها به مدت ۳ روز در زیر هود نگهداری و بعد تلقیح شدند. به‌این‌ترتیب 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 به‌صورت وارونه به مرکز پتری‌دیش‌های محتوای غلظت‌های مختلف عصاره گال انتقال داده شد. سپس محیط کشت‌های تلقیح شده در انکوباتور در دمای ۲۴ درجه سیلسیوس به مدت یک هفته نگهداری شدند. برای هر غلظت و هر جدایه سه تکرار در نظر گرفته شد.

دو قطر عمود بر هم پرگنه هریک 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. براین‌اساس، میزان رشد

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

۲- ارزیابی وزن میسلیوم جدایه‌های قارچی در محیط کشت مایع حاوی غلظت‌های مختلف عصاره گال

برای ارزیابی وزن خشک میسلیوم 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 ململ 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 به‌مدت 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. ارلن‌ها به‌مدت 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 به‌مدت 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 غلظت‌های مختلف عصاره گال تلقیح شد. فلاسک‌ها به‌مدت 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 بوخنر و کاغذ صافی سترون‌شده محیط مایع حاوی کنیدی‌های قارچ از میسلیوم آن جدا گردید. میسلیوم‌های 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 قرار گرفتند. 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. ازآنجایی‌که رسوب اسپور قارچ در ۱۰ میلی‌لیتر آب‌مقطر استریل سوسپانسیون شده بود، در نتیجه نحوه محاسبه تعداد اسپور نهایی به‌شرح زیر انجام شد.

$$\text{۱۰} \times \text{میانگین تعداد اسپور شمارش شده در تکرارهای هر تیمار} \times 10^{4} \times \text{۱۰}^{\text{تعداد رقت}}$$

نتایج آماری با استفاده از آزمون تجزیه واریانس چند طرفه بررسی شد. برای تجزیه‌وتحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS استفاده شد. همچنین مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن و آنالیز واریانس چند طرفه انجام گردید. ملاک معنی‌دار بودن ($P \leq$ ۰/۰۱) در نظر گرفته شد.

نتایج

۱- ارزیابی رشد میسلیوم جدایه‌های قارچی در محیط کشت جامد حاوی غلظت‌های مختلف عصاره گال

نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به تأثیر عصاره‌های مختلف گال روی رشد میسلیوم 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 میسلیوم قارچی نداشته‌اند (جدول ۱).

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

نوع عصاره	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		پیتیوم	فیتوفتورا	فوزاریوم	آلترناریا
عصاره آبی	۳	۰/۶۰۲ ns	۰/۷۸۴ ns	۰/۳۶۷ ns	۰/۱۹۴ ns
عصاره استونی	۳	۰/۳۸۶ ns	۰/۲۷۴ ns	۰/۱۴۵ ns	۰/۱۳۰ ns
عصاره الکلی	۳	۰/۵۷۱ ns	۰/۱۸۰ ns	۰/۲۱۸ ns	۰/۰۷۵ ns

ns= عدم معنی‌دار

بنابراین به‌دلیل معنی‌دار نبودن تفاوت میزان رشد قارچ‌ها در تیمارهای به‌کار برده شده، انجام تجزیه‌وتحلیل‌های آماری به‌منظور سطح‌بندی میانگین داده‌ها به روش آزمون دانکن امکان‌پذیر نبود.

۲- ارزیابی وزن میسلیوم 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 دوزهای مورد استفاده، تأثیر معنی‌داری روی پرآوری پرگنه و وزن میسلیوم قارچ‌ها نداشته‌اند (جدول ۲).

نظر به اینکه نتایج حاصل از بررسی وزن میسلیوم 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.

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

نوع عصاره	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		پیتیوم	فیتوفتورا	فوزاریوم	آلترناریا
عصاره آبی	۳	۰/۰۲۴ ns	۰/۰۱۷ ns	۰/۰۱۸ ns	۰/۰۰۱ ns
عصاره استونی	۳	۰/۰۲۲ ns	۰/۰۰۱ ns	۰/۰۱۲ ns	۰/۰۰۱ ns
عصاره الکلی	۳	۰/۰۱۵ ns	۰/۰۰۱ ns	۰/۰۲۷ ns	۰/۰۰۲ ns

ns= عدم معنی‌دار

۳- ارزیابی تولید اسپور جدایه‌های قارچی در محیط کشت مایع حاوی غلظت‌های مختلف عصاره گال

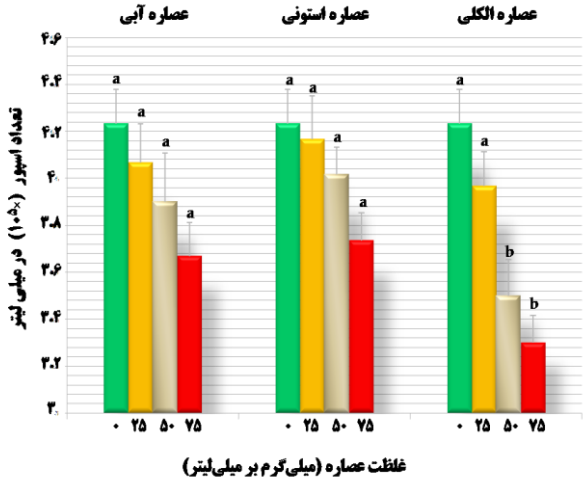
پس از تجزیه آماری نتایج این آزمون مشخص کرد که اضافه نمودن عصاره متانولی گال *A. persica* به محیط کشت موجب تغییر معنی‌دار در میزان تولید اسپور توسط قارچ آلترناریا و فوزاریوم نسبت به شاهد شده است؛ درحالی‌که افزودن عصاره‌های آبی یا استونی در دوزهای مورد استفاده، تأثیر معنی‌داری روی تولید اسپور قارچ‌ها نداشت (جدول ۳).

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس میزان تولید اسپور توسط قارچ‌های آلترناریا و فوزاریوم در محیط کشت مایع حاوی غلظت‌های مختلف از انواع عصاره گال ***Aphelonyx persica***

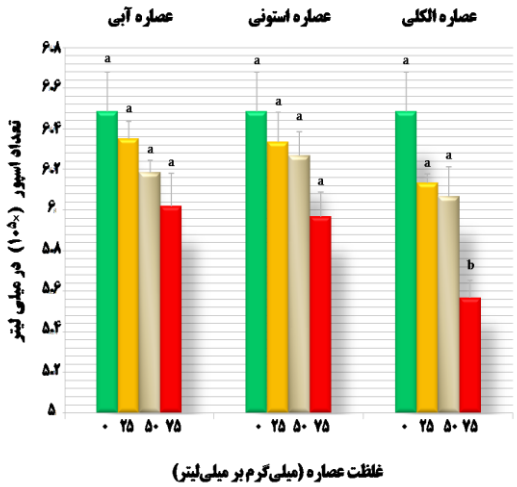
نوع عصاره	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		فوزاریوم	آلترناریا
عصاره آبی	۳	۰/۱۷۶ ns	۰/۱۲۳ ns
عصاره استونی	۳	۰/۱۴۸ ns	۰/۱۴۱ ns
عصاره الکلی	۳	۰/۵۴۶ ★★	۰/۴۲۸ ★★

ns= عدم معنی‌دار ★★: در سطح ۰/۰۱ درصد معنی‌دار

مقایسه میانگین داده‌ها به روش آزمون دانکن نشان داد که اضافه نمودن عصاره متانولی گال به میزان ۵۰ و ۷۰ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر به محیط کشت قارچ فوزاریوم (شکل۴) و به‌میزان ۷۰ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر به محیط کشت قارچ آلترناریا (شکل۵)، به‌طور معنی‌داری موجب کاهش تولید اسپور در محیط‌های کشت مایع شد.



شکل ۴- مقایسه میانگین میزان تولید اسپور توسط قارچ فوزاریوم در محیط کشت مایع حاوی غلظت‌های 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

بحث

با توجه به اینکه درخت بلوط ایرانی گال‌های منحصربه‌فردی دارد که تاکنون مطالعه چندانی در مورد خاصیت ضدمیکروبی آن به تفکیک و با توجه به نوع گال ایجاد شده انجام نشده بود، تحقیق در این زمینه مناسب و کاربردی به‌نظر می‌رسید. ازاین‌رو، 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 الکلی، آبی یا استونی گال *A. persica* در دوزهای مورد استفاده تأثیر معنی‌داری روی رشد و وزن میسلیوم 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. اما در مواقع بروز شرایط نامساعد، بسیاری از قارچ‌ها تولید اسپورهای غیرجنسی را کاهش داده و به‌جای آن اسپورهای جنسی مقاوم یا اسپورهای غیرفعال تولید می‌کنند. ازاین‌رو 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 به‌ترتیب 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 ضدمیکروبی 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 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 به‌دست 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 به‌عنوان آنتی‌بیوتیک و اثر ضدسرطانی آن توسط دانشمندان مختلف و در پژوهش‌های متعددی بررسی شده است که ازجمله 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 ضدمیکروبی داشته است. ازآنجایی‌که تانن از مهمترین مواد مؤثره این گیاه و گال‌های آن با اثرهای قابض و ضدعفونی‌کننده است، به‌نظر می‌رسد که میزان خاصیت ضدمیکروبی 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 پژوهش مشاهده گردید اگرچه تأثیر عصاره گال *A. persica* در دوزهای مورد استفاده روی پرآوری و رشد میسلیوم قارچ‌ها معنی‌دار نبود؛ اما افزایش غلظت عصاره گال در محیط‌های کشت موجب کاهش رشد قارچ‌ها می‌گردد. به‌طوری‌که با مطالعه Safary و همکاران (۲۰۰۹) که بر روی اثر آنتی‌باکتریال بلوط *Querqus 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 ضدمیکروبی 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 *سا پرولگنیا* 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 ضدمیکروبی عصاره *Q. branti* به روش دیسک دیفیوژن 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 به‌دلیل 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. برهمین‌اساس ممکن است خواص دارویی متفاوتی نیز داشته باشند (Sadeghi *et al.*, 2006, 2010). ازاین‌رو توصیه می‌شود تحقیقات دیگری در این زمینه روی سایر گال‌های درختان بلوط انجام و خواص ضدقارچی آن گال‌ها 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 Alegría, F. J. and García 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 Räty, 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 Hidroalcoholic 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 *Quercqus Persica* L Extract on Herpes Simplex 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 rol of methanolic extract of *Querqus infectoria* bark in lipemia & glysemia & gastric ulcer & bacterial growth. The Journal of Medical Research, 2(4): 224-30.

M., Yarmand, H., Askary, H., Stone, G. N., Azizkhani, E., Zargaran, M.R., Aligholizade, D., Barimani H. and Dordaei. A.A. 2006. Oak cynipid gall inquilines 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., Sardsiri, M., Mohammadi, R. and Jabarneyad, A. 2012. Antifungal effect of *Quereus infectoria* gall on *Saprolegnia* fungi. Armaghan Danesh, 17(1): 78-84 (In Persian).

-Shrestha, S, Kaushik, V.S., Eshwarappa, R.S.B., Subaramaihha, 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.

-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., Azuhnwi, B.N., Baert, N., Brinkhaus, A.G., Copani, G., Desrues, 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 entrococcus 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).

-Sadeghi, S.E., Melika, G., Pujade-Villar, J., Penzes, Z.S., Acs, Z., Bechtold, M., Assareh, M. H., Tavakoli,

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. Sadeghi[2]

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*.