اثر بازدارندگی عصاره‌های مختلف گیاه داروواش بر رشد و اسپورزایی قارچ *Aspergillus flavus* در شرایط آزمایشگاهی

فصلنامه بوم‌شناسی گیاهان زراعی
جلد ۱۷، شماره ۳، صفحات ۷۸-۶۹
(پاییز ۱۴۰۰)

سیامک صلاحی ✉
گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، واحد میانه، دانشگاه آزاد اسلامی، میانه، ایران.
(✉ siamak1383@gmail.com : نویسنده مسئول)

چکیده

نزدیک به ۲۰ تا ۴۵ درصد از غلات دنیا به مایکوتوکسین‌های تولید شده بوسیله قارچ‌های انباری، آلوده هستند. قارچ آسپرژیلوس فلاووس (*Aspergillus flavus*) از جمله قارچ‌هایی است که آلودگی وسیعی بر محصولات زراعی و انباری ایجاد می‌کند. در این پژوهش، فعالیت ضد قارچی عصاره‌های مختلف گیاه نیمه انگل داروواش (*Viscum album*) بر رشد و اسپورزایی قارچ آسپرژیلوس فلاووس در شرایط آزمایشگاهی بر اساس طرح کاملا تصادفی با سه تکرار، بررسی شد. از حلال‌های مختلف شامل استون، اتانول، متانول و آب برای استخراج عصاره برگ و جوانه گیاه داروواش، استفاده شد. فعالیت ضد قارچی عصاره‌ها به روش انتشار در سطح آگار، انجام شد. هر کدام از عصاره‌ها در غلظت‌های مختلف (صفر (شاهد)، ۲، ۲۰، ۲۰۰، ۲۰۰۰ میکرو لیتر در ۲۰ میلی لیتر) به محیط کشت افزوده شده و رشد کلونی و اسپورزایی قارچ در این محیط‌ها، ارزیابی شد. کلیه تیمارهای آزمایشی، اثر معنی‌داری بر رشد میسلیوم و اسپورزایی قارچ آسپرژیلوس فلاووس در مقایسه با تیمار شاهد، در سطح ۵ درصد نشان دادند. عصاره متانولی در غلظت ۲۰۰۰ میکرو لیتر، بیشترین اثر را در مهار رشد و نیز اسپورزایی قارچ آسپرژیلوس فلاووس داشته و عصاره آبی، کمترین اثر را نشان داد. علاوه بر این، عصاره استونی در غلظت ۲۰۰۰ میکرو لیتر، موجب مهار ۹۹ درصدی اسپورزایی شد. از این پژوهش می توان نتیجه گرفت که عصاره متانولی داروواش، می‌تواند عامل ضد قارچی مؤثرتری بر مهار رشد و اسپورزایی قارچ آسپرژیلوس فلاووس نسبت به حلال‌های دیگر باشد.

شناسه مقاله

نوع مقاله: پژوهشی
تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۱۷
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۲۵

واژه‌های کلیدی

- آسپرژیلوس فلاووس
- آفلاتوکسین
- اثر ضدمیکروبی
- اثر مهارکنندگی
- داروواش

این مقاله با دسترسی آزاد تحت شرایط و قوانین The Creative Commons of BY-NC-ND انتشار یافته است.

10.22034/AEJ.2021.708296

مقدمه

از جمله اراهکارهای درمان که از دیرباز مورد توجه انسان بوده است، استفاده از گیاهان دارویی می‌باشد. گیاهان دارویی منبع غنی از عوامل ضدمیکروبی هستند که این عوامل، جزء متابولیت‌های ثانویه گیاهان هستند. از جمله این گیاهان دارویی می توان به داروش اشاره نمود (Moradi *et al.*, 2015; Thanaboripat *et al.*, 2007).

داروش با نام علمی *Viscum album* گیاهی نیمه‌انگل، اپی‌فیت، چندساله و همیشه سبز است که در اکثر مناطق جنگلی کشور، یافت می‌شود و با حضور روی میزبان، به دو روش به آن خسارت وارد می‌کند. از یک طرف با جذب آب و تخلیه مواد غذایی، گیاه را با تنش مواجه کرده و از طرف دیگر، بر اثر تحریکات انگل در گیاه میزبان به‌صورت تاولی‌شدن و نیز جارویی و چند شاخه‌شدن، باعث بهم‌خوردن رشد و شکل طبیعی گیاه میزبان شده و در نهایت، رشد طبیعی گیاه میزبان را با مشکل روبرو می‌کند. از دیرباز خواص درمانی این گیاه مورد توجه بوده و گزارش‌های متعددی از اثرات درمانی آن از جمله خاصیت ضدمیکروبی آن ارایه شده است. عصاره گیاه داروش شامل آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، تانن‌ها، آنتراکوئینون‌ها، ساپونین‌ها، گلیکوزیدها، آمین‌ها، ترپنوئیدها و استیل‌کولین بوده که دارای اثرات زیست‌شناختی متعددی مانند فعالیت آنتی‌اُکسیدانی، ضدباکتریایی، ضدقارچی، ضدویروسی و ضدالتهابی می‌باشد (de Rodriguez *et al.*, 2005; Moradi *et al.*, 2015; Zarkovic *et al.*, 2001).

قارچ‌ها از جمله ریزاندام‌واره های (میکروارگانیسم‌های) دخیل در فساد مواد غذایی (بویژه محصولات زراعی و باغی) پس از برداشت هبوده و باعث کاهش ارزش مواد غذایی می‌شوند. از جمله قارچ‌هایی که به صورت غالب روی محصولات انباری و از جمله غلات رشد می کنند، گونه های مختلف قارچ آسپرژیلوس، بویژه گونه آسپرژیلوس‌فلاووس می‌باشد. آسپرژیلوس‌فلاووس جزو قارچ-های رشته ای است که دارای توزیع جهانی بوده و روی انواع کثیری از مواد آلی فاسد شدنی، یافت می‌شود. تقریبا حدود ۲۰ تا ۴۵ درصد از غلات دنیا، به سموم قارچی (مایکوتوکسین‌ها)[1] تولید شده توسط قارچ های انباری، آلوده هستند (Babaei *et al.*, 2015).

آفلاتوکسین[2]، جزو خطرناک‌ترین مایکوتوکسین‌ها (سموم قارچی) بوده که توسط سویه‌های خاصی از آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس، تولید شده و دارای اثرات سمی، سرطان زایی و جهش زایی در انسان و حیوانات است (Gandomi-Nasrabadi *et al.*, 2006; Masood and Ranjan, 1991). کنترل قارچ‌ها معمولا با استفاده از نگهدارنده‌های سنتزی و شیمیایی، انجام می‌شود اما این مواد در اغلب موارد، دارای اثرات جانبی و بیماری های حاد و یا مزمن مثل سرطان کبد و اگر در مقادیر بسیار مصرف شوند، منجر به مرگ می‌شوند (Finkel and Holbrook, 2002; Giudice *et al.*, 2006). این موضوع از یک طرف و افزایش تقاضای مصرف‌کنندگان برای غذاهای تازه با حداقل فرآوری و فاقد نگهدارنده‌های شیمیایی، از طرف دیگر باعث شده در سال های اخیر پژوهش‌ها در راستای استفاده از ترکیبات طبیعی به‌ویژه اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی جهت جلوگیری از رشد قارچ‌ها و تولید سم (توکسین)، متمرکز شود. در طی تحقیقات مختلف، گزارش شده که عصاره‌ها و پودرهای انواع مختلف گیاهان دارویی و روغن‌های استخراج شده از آنها، دارای فعالیت ضدقارچی هستند (Babaei *et al.*, 2015; Majid Khoshkholgh-Pahlaviani *et al.*, 2018; Thanaboripat, 2004; Zarkovic *et al.*, 2001).

1- Mycotoxin
2- Aflatoxin

مسعود و رنجان (۱۹۹۱)، دریافتند که عصاره های گیاه آرگمون مکزیکی[1] (خشخاش مکزیکی) و گیاه سعد کوفی[2]، تولید آفلاتوکسین را بواسطه مهار رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس، مهار می‌کند. نتایج نشان داده که مهار تولید و تشکیل آفلاتوکسین، در نتیجه مهار رشد قارچ آسپرژیلوس بوده است (Masood and Ranjan, 1991). وجود ترکیب های مفید بازدارنده در گیاهان، ذخیره ارزشمندی را در اختیار پژوهشگران قرار داده و به نظر می رسد که سازوکار (مکانیسم) اثر عصاره داروا‌ش بر عملکرد قارچ آسپرژیلوس فلاووس، بواسطه وجود انواع ترکیبات از جمله انواع آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، تانن ها و آنتراکوئینون ها بوده که دارای تأثیرات زیست شناختی متعددی مانند فعالیت آنتی اُکسیدانی، ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد ویروسی و ضد التهابی می باشد (Deliorman *et al.*, 2001; Ertürk, 2010; Ertürk *et al.*, 2003; Giudice *et al.*, 2006).

هدف از انجام این پژوهش، بررسی تأثیر عصاره برگ‌ها و جوانه های گیاه داروا‌ش (با استفاده از حلال های آلی شامل استون، اتانول، متانول و آب)، بر ممانعت از رشد شعاعی قارچ آسپرژیلوس فلاووس بوده است. همچنین، تأثیر عصاره های داروا‌ش بر میزان تولید اسپور (اسپورزایی) این قارچ در شرایط آزمایشگاهی[3] در محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار[4] (PDA) بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

آماده سازی مواد گیاهی

در این پژوهش، برگ ها و جوانه های تازه گیاه داروا‌ش از روی درختان زالزالک در منطقه کاغذکنان شهرستان میانه، جمع آوری گردیده و از نظر جنس و گونه توسط متخصصان گیاه شناسی، مورد تایید قرار گرفت. برای عصاره گیری از گیاه داروا‌ش و تهیه عصاره های استونی، آبی و الکلی (اتانولی و متانولی) از روش پرکولاسیون[5] استفاده گردید. روش کار به این صورت بوده که پس از خشک کردن گیاه داروا‌ش در سایه و تحت دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه سلسیوس، نمونه‌های خشک‌شده توسط دستگاه خردکن الکتریکی، آسیاب شدند.

آماده سازی عصاره‌ها

۳۰ گرم از مواد گیاهی پودر شده با ۱۰۰ میلی لیتر از حلال‌های مختلف شامل استون، اتانول، متانول و آب مخلوط شده و به مدت ۷۲ ساعت، در دمای اتاق قرار داده شدند. سپس محتویات گیاهی مربوط به هر حلال از کاغذ صافی واتمن شماره یک، گذرانده شدند. مواد صاف شده توسط حمام بخار آب در دمای ۷۰-۶۰ درجه سلسیوس تبخیر شده تا خشک شوند. عصاره‌های خشک شده، پودر گردیده و در مقادیر کمی از حجم‌های مساوی از حلال های مربوطه و آب مقطر استریل (۵۰:۵۰، نسبت حجم به حجم) دوباره حل گردیده و در دمای ۴ درجه سلسیوس تا زمان آزمایش، نگهداری شدند (Ertürk, 2010; Hussain *et al.*, 2011).

1- *Argemone mexicoana*
2- *Cyperus rotundous*
3- *In vitro* conditions
4- Potato Dextrose Agar
5- Percolation

سویه قارچ[1]

در این پژوهش، قارچ *Aspergillus flavus* ATCC 5004 از بخش قارچ‌شناسی دانشکده گیاهپزشکی دانشگاه تهران، تهیه گردید. قارچ ها روی محیط کشت شیب‌دار (PDA) کشت داده شده بودند. از قارچ‌های کشت داده شده در آزمایشگاه، به عنوان ذخیره قارچی استفاده گردید و کپک آسپرژیلوس روی محیط PDA به مدت ۷ روز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس کشت داده شد و تشتک های پتری بعد از ۷ روز کشت، در دمای ۴ درجه سلسیوس برای مطالعه بیشتر، نگهداری شدند.

بررسی فعالیت ضد قارچی عصاره های استخراج شده به روش Agar Plate Diffusion

به منظور بررسی فعالیت ضد قارچی عصاره‌های استخراج شده توسط حلال های مختلف از روش Agar Plate Diffusion استفاده گردید. بدین منظور غلظت های ۰، ۲، ۲۰، ۲۰۰ و ۲۰۰۰ میکرولیتر بر ۲۰ میلی لیتر، از عصاره ها به محیط کشت PDA مذاب که حرارت آن در داخل تشتک پتری ها به ۷۰-۶۰ درجه سلسیوس رسیده بود، اضافه گردیده و سپس مخلوط شدند. بعد از جامد شدن محیط های کشت، دیسک‌هایی از قارچ های کشت داده شده (در حدود ابعاد ۰/۴ میلی‌متر) را از سویه های استاندارد در مرکز هر تشتک پتری مربوط به غلظت های مختلف عصاره ها، به صورت نقطه ای قرار داده و کشت ها به مدت ۷ روز در دمای ۲۶ درجه سلسیوس، گرمادهی شدند. برای هر یک از تیمار ها، سه تکرار و PDA بدون عصاره به عنوان تیمار شاهد، در نظر گرفته شد. در پایان روز هفتم، میزان رشد شعاعی قارچ ها بر حسب سانتی متر، اندازه گیری و داده ها تجزیه آماری شدند. در مورد پلیت هایی که رشدی نشان ندادند، دیسک ها به محیط فاقد عصاره، انتقال داده شده تا اثر بازدارندگی یا کشندگی، مشخص شود. میزان مهار رشد قارچی با توجه به فرمول ذیل اندازه گیری شد (Jasso de Rodriguez *et al.*, 2005).

قطر کلنی شاهد/ قطر کلنی تیمار شده - قطر کلنی شاهد= ۱۰۰× درصد مهار رشد میسلیوم

ارزیابی تولید اسپور

۰/۱ میلی لیتر از سوسپانسیون اسپور در پلیت های PDA حاوی غلظت های مختلف عصاره تلقیح شده و در تمام سطح محیط پخش شد. پلیت ها به مدت ۷ روز در انکوباتور تحت دمای ۲۶ درجه سلسیوس، نگهداری شدند. کل توده میسلیوم تولید شده در هر پلیت به یک فلاسک حاوی ۵۰ میلی لیتر آب مقطر، انتقال داده شد. برای جداسازی اسپورها از تکه های آگار، کنیدی ها توسط عمل سانتریفیوژ جمع آوری شدند. غلظت کنیدی‌ها به وسیله لام هماسیتومتر شمارش شده و به صورت تعداد اسپور در هر سانتی‌متر مربع از پلیت، محاسبه گردید. به ازای هر غلظت، سه پلیت استفاده شده و کل آزمایش سه بار تکرار شد (Gandomi-Nasrabadi *et al.*, 2006).

تجزیه و تحلیل آماری

این پژوهش در شرایط آزمایشگاهی با طرح پایه کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد. از تجزیه واریانس یک طرفه جهت مقایسه میانگین ها استفاده شد. برای مقایسات میانگین داده ها از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح ۵ درصد، استفاده شد. تجزیه آماری با استفاده از نرم افزار آماری SPSS-19.0 انجام شد.

1- Fungi strain

نتایج و بحث

نتایج اثر غلظت‌های مختلف عصاره داروا‌ش با حلال‌های مختلف بر رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس ذکر شده است (جداول ۱- ۴). طبق نتایج بدست آمده در این پژوهش، بیشترین و موثرترین مهار رشدی در غلظت‌های مختلف، مربوط به عصاره متانولی بوده است. عصاره متانولی گیاه داروا‌ش در غلظت ۲۰۰۰ میکرولیتر، اثر بازدارندگی ۱۰۰ درصدی را بر رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس داشته و کمترین اثر مهارکنندگی مربوط به غلظت ۲ میکرولیتر (۱۷/۶ درصد) بوده است. در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر تا روز سوم، هیچ رشدی مشاهده نشده و بعد از آن هم سرعت رشد نسبت به نمونه شاهد، بسیار کمتر بوده است. کلیه غلظت‌های مورد استفاده، دارای اثر مهارکنندگی معنی‌داری بر رشد کپک قارچ بوده است ($p <$ ۰/۰۵). نتایج حاصل نشان می‌دهد که این اثر دارای الگوی وابسته به دز بوده و با افزایش غلظت عصاره، اثر مهارکنندگی نیز افزایش می‌یابد، بطوریکه عصاره‌های استخراج‌شده داروا‌ش توسط حلال‌های استون، اتانول و آب در بیشترین غلظت (۲۰۰۰ میکرولیتر)، به ترتیب ۷۵/۶، ۵۴/۷ و ۵۱/۷ درصد و در کمترین غلظت (۲ میکرولیتر)، به ترتیب با ۱۳/۶، ۱۲/۸ و ۱۰/۳ درصد، باعث ممانعت از رشد قارچ شدند. نتایج حاصل از تولید اسپور (اسپورزایی)، نشان می‌دهد که عصاره داروا‌ش بر اسپورزایی هم اثر بازدارندگی داشته و این اثر در کلیه غلظت‌های تیمارهای اعمال‌شده، معنی‌دار بوده است ($p <$ ۰/۰۵). نتایج حاصل از بررسی‌های میکروسکوپ نوری نیز نشان می‌دهد که کلنی رشد کرده در محیط فاقد عصاره، به شدت اسپورزایی کرده و ساختار تشکیل‌دهنده اسپور، تمام سطح کلنی را پوشانده، بطوریکه توده میسلیوم قارچ قابل رویت نبوده است.

برخی پژوهشگران معتقدند که تنظیم سنتز آفلاتوکسین و تولید اسپور، به یکدیگر وابسته بوده و علت عدم تولید آفلاتوکسین در سویه های غیر سمی (غیر توکسیژنیک) آسپرژیلوس فلاووس را به تغییرات مورفولوژی کنیدی‌ها و یا عدم توانایی تولید کنیدی نسبت داده اند (Gandomi-Nasrabadi *et al.*, 2006). پژوهش های جیودیس و همکاران (۲۰۰۶)، نشان داد که فعالیت ضد قارچی ویسکوتوکسین ایزوفرم (VtA_3) (سم تولیدشده توسط داروا‌ش) به‌دلیل اتصال به غشاء و تشکیل کانال، منجر به بی‌ثباتی و اختلال در نفوذپذیری غشاء پلاسمایی قارچ می شود (Giudice *et al.*, 2006). همچنین، گزارش شده که مهار رشد قارچ در اثر اسانس های آویشن، نعناع و اسطوخودوس با دژنره شدن (انحطاط) هیف‌های قارچ، مرتبط است. (Gandomi-Nasrabadi *et al.*, 2006). ارترک و همکاران (۲۰۰۳)، فعالیت ضدمیکروبی عصاره اِن- هگزانی داروا‌ش بر علیه شش گونه باکتری گرم مثبت و گرم منفی و نیز قارچ کاندیدا آلبیکانس[1] را گزارش نمودند (Ertürk *et al.*, 2003). نتایج نشان داد که نوع حلال، در استخراج متابولیت‌های فعال گیاه، موثر است و عصاره گیاه در حلال‌های مختلف، می‌تواند اثرات متفاوتی را در کنترل قارچ‌ها داشته باشد. بابایی و همکاران (۲۰۱۵)، طی پژوهشی اثر غلظت‌های مختلف عصاره برگی گیاه آلوئه‌ورا[2] در حلال های مختلف بر رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس و تولید آفلاتوکسین را مورد بررسی قرار دادند (Babaei *et al.*, 2015). گندمی نصرآبادی و همکاران (۲۰۰۶)، نیز گزارش نمودند که اسانس آویشن شیرازی در غلظت‌های مختف، اثر معنی‌داری بر رشد و اسپورزایی قارچ آسپرژیلوس فلاووس دارد (Gandomi-Nasrabadi *et al.*, 2006). تانابوریپات (۲۰۰۴)، هم اثر بازدارندگی از رشد قارچ *A. flavus* و *A. parasitcus* را توسط عصاره روغنی گیاه سیترونلا[3] در محیط کشت PDA گزارش نمودند (Thanaboripat, 2004). در این پژوهش عصاره داروا‌ش از برگ‌ها و جوانه های تازه گیاه استخراج گردید. به نظر می‌رسد مراحل مختلف رشد گیاهان، حاوی مقادیر و حتی انواع متفاوتی از متابولیت‌های موثر بر رشد قارچ ها

1- *Candida albicans*
2- *Aloe vera*
3- *Cymbopogon citratus*

می‌باشد و استخراج عصاره گیاهان در مراحل مختلف رشدی آنها، می‌تواند نتایج متفاوتی داشته باشد (Abdolmaleki *et al.*, 2011; Hussain *et al.*, 2011; Jasso de Rodriguez *et al.*, 2005). طبق نتایج حاصل عصاره های آلی فعالیت ضد قارچی قابل توجهی در مقایسه با عصاره های آبی از خود نشان دادند. حلال های مختلف سطوح مختلفی از حلالیت برای ترکیبات زیست فعال مختلف دارند. دلیل این نتیجه در فعالیت ممکن است بخاطر وجود برخی ترکیبات زیست فعال باشد که موجب فعالیت ضد میکروبی گشته و در مقایسه با حلال های آبی به راحتی در حلال های آلی حل می شوند. ان یوکی و همکاران (۲۰۱۷)، هم گزارش دادند که عصاره های آلی گیاهان مختلف دارای درصد بیشتری از ترکیبات فعال زیستی (۶۰/۸ درصد)، نسبت به عصاره های آبی (۳۹/۲ درصد) بر رشد و فعالیت قارچ آسپرژیلوس فلاووس بودند. (Njoki *et al.*, 2017).

نتیجه‌گیری کلی

اقبال عمومی به کاهش مصرف سموم، پژوهشگران را برآن داشته تا درصدد دستیابی به ترکیباتی طبیعی و سازگار با محیط زیست برآیند. ترکیباتی که علی‌رغم کارایی، به سرعت تجزیه‌شده و باقیمانده کمتری در مواد غذایی برجای گذارند. نتایج این پژوهش، اثر مهارکنندگی عصاره‌های متانولی و استونی گیاه نیمه‌انگل درواش بر قارچ آسپرژیلوس فلاووس را به‌خوبی نشان داد. بررسی‌های تکمیلی سم‌شناسی و میکروبی این عصاره‌ها، می‌تواند آنها را به‌عنوان جایگزینی برای نگهدارنده‌های شیمیایی در مواد غذایی و بویژه جلوگیری از آلودگی محصولات زراعی بعد از برداشت در انبار توسط عوامل میکروبی اعم از قارچ‌ها و باکتری‌های ساپروفیت و بیماریزا معرفی نماید. با توجه به رشد سریع قارچ آسپرژیلوس فلاووس روی محصولات غذایی و خسارت‌هایی که بر مواد غذایی، محصولات کشاورزی و همچنین صنایع غذایی ایجاد می‌کند، جلوگیری از رشد این قارچ با استفاده از مهارکننده‌های طبیعی با دستیابی به روش‌های جدیدتر و ایمن‌تر، می‌تواند کمک شایانی در حوزه‌های مختلف سلامت و اقتصاد، اعمال نماید.

References

Abdolmaleki M, Bahraminejad S, Abbasi S. Antifungal activity of some plant crude extracts on four phytopathogenic fungi. *Journal of Medicinal Plants*. **2011**, 10(38): 148-155.

Babaei A, Manafi M, Tavafi H. Effect of the leaf extract of aloe vera on growth, production of aflatoxin B1 and profile of extracellular proteins of *Aspergillus flavus* in vitro. Cellular and Molecular Research. *Iranian Journal of Biology*. **2015**, 28(1): 35-44.

de Rodriguez D, Hernandez-Castillo R, Rodriguez-Garcia J. Antifungal activity *in vitro* of *Aloe vera* pulp and liquid fraction against plant pathogenic fungi. *Industrial Crops and Products*. **2005**, 21(1): 81-87.

Deliorman D, Ergun F, Sener B, Palittapongarnpim P. Evaluation of antimycobacterial activity of *Viscum album* subspecies. *Pharmaceutical Biology*. **2001**, 39: 381-383.

Ertürk, Ö, Kati H, Yaylini N. Antimicrobial activity of *Viscum album* L. subsp. abietis (Wiesb.). *Turkish Journal of Biology*. **2003**, 27: 34-40.

Ertürk Ö. Antibacterial and antifungal effects of alcoholic extracts of 41 medicinal plants growing in Turkey. *Czech Journal of Food Science*. **2010**, 28: 53-60.

Finkel T, Holbrook N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. **2002**, 408, 239-247.

Gandomi-Nasrabadi H, Misaghi A, Akhondzadeh Basti A, Khosravi A, Bokaei S, Abbasifar A. Effects of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil on *Aspergillus flavus*. *Journal of Medicinal Plants*. **2006**, 7(27):45-51.

Giudice M, Poveda J.A, Molina M.L, de la Canal L, González-Ros J.M. Antifungal effects and mechanism of action of viscotoxin A3. *The FEBS Journal*. **2006**, 273(1):72-83.

Hussain M.A, Khan M.Q, Hussain N, Habib T. Antibacterial and antifungal potential of leaves and twigs of *Viscum album* L. *Journal of Medicinal Plants*. **2011**, 5: 545-554.

Majid Khoshkholgh-Pahlaviani M.R, Kazemi Darsanaki R, Bidarigh S. Antimicrobial activities of some plant extracts against phytopathogenic fungi and clinical isolates in Iran. *Journal of Medicinal Bacterial*. **2018**, 3(4): 5-16.

Masood A, Ranjan K.S. The effect of aqueous plant extracts on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. *Letter in Applied Microbiology*. **1991**, 13(1): 32-34.

Moradi S, Falahatkar B, Sattari M, Alishahi M. Effect of different levels of hydroalcoholic extract of *Viscum album* on growth and hematological indices in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). *Aquaculture Sciences*. **2019**, 6(2): 1-12.

Njoki L.M, Okoth S.A, Wachira P.M. Effects of medicinal plant extracts and photosensitization on aflatoxin producing *Aspergillus flavus* (Raper and Fennell). *International Journal Microbiology*. **2017**, 16: 132-139.

Thanaboripat, D. Inhibition of aflatoxin production and growth of *Aspergillus flavus* by citronella oil. *KMITL Science and Technology Journal*. **2004**, 4: 2-9.

Thanaboripat D, Suvathi Y, Srilohas Srilohasin P, Sripakdee S, Patthanawanitchai O, Chareonsettasilp S. Inhibitory effect of essential oils on the growth of *Aspergillus flavus*. *KMITL Science and Technology Journal*. **2007**, 3(1):18-24.

Yoon T.J, Park K.H, Choi S.H. Korean mistletoe (*Viscum album*) extract induces eel (*Anguilla japonica*) non-specific immunity. *Immune Network*. **2008**, 8: 24-129.

Zarkovic K, Vukovic T, Loncaric I, Miletic M, Zarkovic K, Borovic S, Cipak A, Sabolovic S, Konitzer S, Mang S. An overview on anticancer activities of the *Viscum album* extract isorel. *Cancer Biother Radiopharm*. **2001**, 1: 55-62.

The inhibitory effect of different mistletoe extracts on the growth and sporulation of *Aspergillus flavus in vitro*

Agroecology Journal

Vol. 17, No. 3 (69-78)
(Autumn 2021)

Siamak Salahi✉
Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Miyaneh Branch, Islamic Azad University, Miyaneh, Iran.
✉ siamak1383@gmail.com **(*Corresponding author*)**

Received date: 05.02.2021 Accepted date: 16.09.2021

Abstract

Nearly 20 to 45 percent of the world's grains were exposed to mycotoxins produced by the fungus. *Aspergillus flavus* is one of the fungi that cause widespread contamination of crops and warehouse products. In this research, the antifungal activity of different extracts of the semi-parasitic mistletoe (*Viscum album*) plant on the growth and sporulation of *Aspergillus flavus* in laboratory conditions based on completely random design with three replications was evaluated. Various solvents including acetone, ethanol, methanol and water were used to extract mistletoe leaves and buds. Antifungal activity of the extracts was performed by diffusion method on the surface of agar. Each of the extracts including 0 (control), 2, 20, 200 and 2000 microliters per 20 milliliters were added to medium and colony growth and sporulation of fungi were evaluated. All experimental treatments showed a significant effect on mycelium growth and sporulation of *Aspergillus flavus* compared to control at 5% level. Methanol extract in 2000 microliters had the most effect on fungi growth and sporulation, and mistletoe water extract showed the least effect. Moreover, acetone extract in 2000 microliters, inhibited sporulation by 99 %. It can be concluded that the methanol extract of mistletoe can be a more effective antifungal agent to inhibit the growth and sporulation of *Aspergillus flavus* than other solvents.

Keywords

- Aflatoxin
- Antimicrobial effect
- *Aspergillus flavus*
- Inhibitory effect
- *Viscum album*

This open-access article is distributed under the terms of the Creative Commons-BY-NC-ND which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

10.22034/AEJ.2021.708296

جدول۱- اثر غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی داروش بر رشد میسلیوم و اسپوزرایی قارچ آسپرژیلوس فلاووس.

Table 1- The effect of different concentrations of mistletoe ethanolic extract on mycelium growth and sporulation of *Aspergillus flavus*.

Fungi Traits				
Ethanolic Extract (Microliter/20 mL)	Colony Diameter (mm)*	Inhibition of Mycelium Growth (%) **	Number of Spores/mL	Inhibition of Spore Production (%)
0	58.25±2.4 a	0.00	$(2.4\pm0.4)\times10^8$	0.00 d
2	50.5±3.2 b	12.90	$(2.2\pm0.3)\times10^8$	5.20 c
20	38.75±4.5 c	33.00	$(1.8\pm0.1)\times10^8$	22.70 bc
200	30.5±1.8 d	47.40	$(1.7\pm0.6)\times10^8$	25.70 b
2000	26.25±3.4 de	54.80	$(1.1\pm0.4)\times10^8$	50.40 a

* - SE ± قطر کلونی: SE خطای معیار سه آزمایش مجزا با چهار تکرار در هر آزمایش است.

*- SE ± colony diameter: SE is the standard error of three separate experiments with four replicates per experiment.

** - SE ± تعداد اسپور: SE خطای معیار دو آزمایش مجزا با سه تکرار در هر آزمایش است.

**- SE ± number of spores: SE is the standard error of two separate experiments with three replicates per experiment.

- حروف غیرمشابه در هر ستون، نشانه اختلاف آماری معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.

جدول۲- اثر غلظت‌های مختلف عصاره استونی داروش بر رشد میسلیوم و اسپوزرایی قارچ آسپرژیلوس فلاووس.

Table 2- The effect of different concentrations of mistletoe asetonic extract on mycelium growth and sporulation of *Aspergillus flavus*.

Fungi Traits				
Acetonic Extract (Microliter/20 mL)	Colony Diameter (mm) *	Inhibition of Mycelium Growth (%) **	Number of Spores/ mL	Inhibition of Spore Production (%)
0	58.10±0.6 a	0.00	$(2.3\pm0.4)\times10^8$	0.00 e
2	52.75±3.2 b	13.20	$(2.0\pm0.3)\times10^8$	16.70 d
20	35.75±2.5 c	35.40	$(1.3\pm0.4)\times10^8$	43.70 c
200	22.25±2.8 d	61.40	$(3.7\pm0.6)\times10^7$	84.40 b
2000	14.25±4.2 e	75.20	$(1.5\pm0.7)\times10^6$	99.40 a

* - SE ± قطر کلونی: SE خطای معیار سه آزمایش مجزا با چهار تکرار در هر آزمایش است.

*- SE ± colony diameter: SE is the standard error of three separate experiments with four replicates per experiment.

** - SE ± تعداد اسپور: SE خطای معیار دو آزمایش مجزا با سه تکرار در هر آزمایش است.

**- SE ± number of spores: SE is the standard error of two separate experiments with three replicates per experiment.

- حروف غیرمشابه در هر ستون، نشانه اختلاف آماری معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.

جدول۳- اثر غلظت‌های مختلف عصاره آبی بر رشد میسلیوم و اسپوزرایی قارچ آسپرژیلوس فلاووس.

Table 3- The effect of different concentrations of mistletoe aqueous extract on mycelium growth and sporulation of *Aspergillus flavus.*

Fungi Traits				
Aqueous Extract (Microliter/20 mL)	**Colony Diameter (mm) ***	**Inhibition of Mycelium Growth (%) ****	**Number of Spores/ mL**	**Inhibition of Spore Production (%)**
0	58.0±0.3 a	0.00	$(2.3\pm0.2)\times10^{8}$	0.00 e
2	52.5±2.2 b	10.30	$(2.2\pm0.3)\times10^{8}$	4.00 d
20	40.5±43.5 c	31.40	$(2.0\pm0.3)\times10^{8}$	14.50 c
200	34.5±1.8 d	41.40	$(1.8\pm0.3)\times10^{8}$	24.30 b
2000	28.25±2.4 e	51.70	$(1.3\pm0.5)\times10^{8}$	43.40 a

* - SE ± قطر کلونی: SE خطای معیار سه آزمایش مجزا با چهار تکرار در هر آزمایش است.

*- SE ± colony diameter: SE is the standard error of three separate experiments with four replicates per experiment.

** - SE ± تعداد اسپور: SE خطای معیار دو آزمایش مجزا با سه تکرار در هر آزمایش است.

**- SE ± number of spores: SE is the standard error of two separate experiments with three replicates per experiment.

– حروف غیرمشابه در هر ستون، نشانه اختلاف آماری معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.

جدول۴- اثر غلظت‌های مختلف عصاره متالونی داروش بر رشد میسلیوم و اسپوزرایی قارچ آسپرژیلوس فلاووس.

Table 4- The effect of different concentrations of mistletoe methanolic extract on mycelium growth and sporulation of *Aspergillus flavus.*

Fungi Traits				
Methanolic Extract (Microliter/20 mL)	**Colony Diameter (mm) ***	**Inhibition of Mycelium Growth (%) ****	**Number of Spores/ mL**	**Inhibition of Spore Production (%)**
0	58.0±0.4 a	0.00	$(2.3\pm0.4)\times10^{8}$	0.00 d
2	47.5±3.2 b	17.50	$(2.0\pm0.1)\times10^{8}$	13.20 c
20	35.75±4.5 c	38.30	$(1.1\pm0.2)\times10^{8}$	54.70 b
200	16.2±1.8 d	72.40	$(1.5\pm0.3)\times10^{7}$	93.70 ab
2000	0.0±0.4 e	100.00	0.00	100.00 a

* - SE ± قطر کلونی: SE خطای معیار سه آزمایش مجزا با چهار تکرار در هر آزمایش است.

*- SE ± colony diameter: SE is the standard error of three separate experiments with four replicates per experiment.

** - SE ± تعداد اسپور: SE خطای معیار دو آزمایش مجزا با سه تکرار در هر آزمایش است.

**- SE ± number of spores: SE is the standard error of two separate experiments with three replicates per experiment.

– حروف غیرمشابه در هر ستون، نشانه اختلاف آماری معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.