اثرات هم‌افزایی ضد قارچی آفت‌کش‌های آلی و عصاره حاصل از پوست درونی ساقه زرشک (*Berberis vulgaris*) بر روی قارچ مولد پوسیدگی سفید

لطیف نظری[۱] و سیدخلیل حسینی‌هاشمی[۲*]

۱) دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه علوم و صنایع چوب و کاغذ، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، کرج، ایران.
۲) دانشیار گروه علوم و صنایع چوب و کاغذ، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، کرج، ایران. *رایانامه نویسنده مسئول: hashemi@kiau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۵/۰۳/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۱/۱۱

چکیده

در این پژوهش اثرات مستقل و ترکیبی سه آفت‌کش آلی (پروپیکونازول، تبوکونازول و کلروتالونیل) و عصاره آب- متانولی پوست درونی (آندودرم) ساقه زرشک (*Berberis vulgaris*) با غلظت‌های مختلف (۵۰، ۱۵۰، ۲۵۰، ۳۵۰ و ۴۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) در برابر قارچ مولد پوسیدگی سفید رنگین‌کمان (*Trametes versicolor*) مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش‌ها در محیط آزمایشگاهی و با استفاده از محیط کشت مالت اکستراکت آگار و روش انتشار (روش اصلاح شده استاندارد CLSI (۲۰۰۸)) انجام شد. پتریدیش‌ها به مدت یک هفته در داخل انکوباتور با دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد و ۷۵ درصد رطوبت نسبی قرار داده شدند و روزانه به مدت یک هفته، رشد میسیلیوم قارچ و اثرات بازدارندگی محلول‌های حفاظتی مختلف در برابر قارچ، مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که عصاره پوست درونی ساقه زرشک و آفت‌کش کلروتالونیل به تنهایی هیچ اثر بازدارندگی بر روی رشد قارچ نداشته‌اند، در حالی که آفت‌کش‌های پروپیکونازول و تبوکونازول به تنهایی اثر معنی‌داری در غلظت‌های مختلف بر رشد قارچ داشته‌اند. در بررسی اثرات ترکیبی محلول‌های حفاظتی، این طور نشان داده شد که تبوکونازول در غلظت ۴۵۰ میلی‌گرم بر لیتر و پروپیکونازول در تمامی غلظت‌های ذکر شده به همراه عصاره پوست درونی ساقه زرشک توانسته است تا حدود قابل قبولی از رشد قارچ جلوگیری کند. نتیجه نهایی اینکه آفت‌کش‌های پروپیکونازول و تبوکونازول می‌توانند به همراه عصاره پوست درونی ساقه زرشک، اثر هم‌افزایی را در جلوگیری از رشد قارچ مورد آزمون ایجاد کنند.

واژه‌های کلیدی: آفت‌کش آلی، ساقه زرشک، عصاره پوست درونی، قارچ رنگین‌کمان، هم‌افزایی.

مقدمه

مواد حفاظتی چوب طیف گسترده‌ای از فعالیت را بر علیه موجودات مخرب چوب دارند، اما در حال حاضر با توجه به نگرانی‌های زیست‌محیطی و به خاطر ترکیبات سمی در فرمول آنها، میزان استفاده از آنها محدود شده است. خطرات زیست‌محیطی و هزینه‌های مواد حفاظتی چوب، متخصصان را به فکر به حداقل رساندن مقدار ترکیبات فعال در مواد حفاظتی چوب و افزایش نیاز به جایگزینی مواد حفاظتی چوب با موادی که برای محیط‌زیست خطرساز نباشند، انداخته است. یکی از این روش‌های بالقوه، استفاده از مواد استخراجی چوب درون است، زیرا ترکیبات آن هم فعالیت ضد قارچی و هم فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارند (Kamdem & Nzokou, 2002;

(Hosseini Hashemi & Jahan Latibari, 2011). روش دیگر برای کاهش هزینه تیمار چوب، ترکیب کردن دو یا چند ترکیب فعال و اثر هم‌افزایی آنها است. مزایای ترکیب دو یا چند آفت‌کش مدت زیادی است که شناخته شده و استفاده از آنها عمر مفید چوب در برابر عوامل مخرب بیولوژیک را افزایش داده است (Green III & Schultz, 2003).

ترکیب آفت‌کش‌ها با افزودنی‌های غیر آفت‌کش به‌منظور افزایش کارآیی مواد حفاظتی به‌کار می‌رود و همچنین هزینه ماده حفاظتی را کاهش می‌دهد. افزودنی‌های غیر آفت‌کش خاصیت حفاظتی کمی دارند یا اصلا خاصیت آفت‌کشی ندارند، اما وقتی که همان افزودنی به صورت ترکیبی با آفت‌کش مورد استفاده قرار می‌گیرد، حفاظت بسیار بالایی را در برابر قارچ و موریانه ایجاد می‌کند که آفت‌کش به تنهایی چنین حفاظتی را نمی‌تواند ایجاد کند (Goodell *et al.*, 2003).

در دهه‌های اخیر مطالعه‌هایی بر روی خواص داروشناختی آلکالوئیدهای گیاه زرشک (*Berberis vulgaris*) انجام شده است که اثرات ضد میکروبی و ضد قارچی و ضد انگلی آن را نشان می‌دهد (Saeed *et al.*, 2007). بر اساس پژوهش‌های انجام شده، بیشتر خواص دارویی زرشک مربوط به آلکالوئیدهای مختلف در اندام‌های مختلف این گیاه است. در تمام قسمت‌های این گیاه آلکالوئیدهای بربرین[1]، اکسی-کانتین[2] و بربامین[3] وجود دارد (Liu *et al.*, 1991). مقدار آلکالوئید در پوست ریشه زرشک بیشتر از قسمت‌های دیگر این گیاه است (Saeed *et al.*, 2007). سایر آلکالوئیدهای مختلف زرشک شامل بربامین، بربروبین[4]، ژاتوریزین[5]، اکسی‌کانتین، پالماتین[6]، بولیسین[7]، کولومباین[8] و والرسین[9] و ترکیبات دیگر هستند (کافی و بالندری، ۱۳۸۱).

Lei و همکاران (۲۰۱۱)، اثر ترکیبی ایتراکونازول (ICZ) و بربرین (BER) را در برابر قارچ *Aspergillus fumigatus* مورد بررسی قرار دادند. در این پژوهش مقاومت آزمایشگاهی قارچ *Aspergillus fumigatus* جدا شده از بیماران بالینی در برابر ICZ و BER مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. حداقل غلظت بازدارنده BER، ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ICZ، ۲۵۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده است. در این آزمون کلونی‌های بزرگ را با و یا بدون BER مورد مقایسه قرار دادند و نتیجه نشان داد که BER می‌تواند باعث جلوگیری از رشد و تولید رنگدانه اسپور قارچ *Aspergillus fumigatus* گردد. همچنین ترکیب این دو دارو نیز مورد بررسی قرار گرفت که در نتیجه، این دو دارو هیچ گونه اثر ترکیبی نداشتند و این طور توصیه شد که BER و ICZ به‌طور هم‌زمان و ترکیبی در درمانگاه‌ها مورد استفاده قرار نگیرند.

Hwang و همکاران (۲۰۰۶)، اثر ترکیبی مواد استخراجی چوب‌درون و ترکیبات آمونیوم چهار ظرفیتی (QAC) را برای مقابله با موریانه بر روی چوب‌های تیمار شده مورد بررسی قرار دادند. مواد استخراجی چوب‌درون گونه‌های *Chamaecyparis obtusa*، *Cryptomeria japonica*، *Larix kaempferi*، *Pseudotsuga menziessi* و *Tsuga heterophylla* *Sarg.* توسط حلال‌های آب داغ و آب داغ + اتانول/ بنزن استخراج گردید، به طوری که درصد مواد استخراجی در حلال آب داغ + اتانول/ بنزن بیشتر بود. سپس نمونه‌های چوبی با مواد استخراجی و بدون

[1] Berberine
[2] Oxicanthine
[3] Berbamine
[4] Berberubine
[5] Jatrorrhizine
[6] Palmatine
[7] Bollicine
[8] Columbamine
[9] Valercine

مواد استخراجی به همراه محلول تجارتی DBF (دی دسیل دی متیل آمونیوم تترا فلورو بورات) و یا DDAC (دی دسیل دی متیل آمونیوم کلراید) اشباع شدند و به مدت ۳ هفته در شرایط آزمایشگاهی در معرض موریانه *Coptotermes formosanus* قرار داده شدند. نتایج این پژوهش نشان داد که ترکیب مواد استخراجی چوب‌درون نمونه‌های چوبی و مواد حفاظتی (DBF- DDAC) باعث افزایش مقاومت در برابر حمله موریانه‌ها شده و در نتیجه کاهش جرم نمونه‌های چوبی تیمار شده با مواد استخراجی نسبت به نمونه‌های شاهد کمتر بوده است.

Yen و Chang (۲۰۰۸)، اثرات ترکیبی استفاده از سینامالدئید[1] با کاتکین[2]، کوئرستین[3] و یا ائوگنول[4] را در برابر قارچ مولد پوسیدگی چوب *Laetiporus sulphureus* مورد مقایسه قرار دادند که در بین تمام ترکیبات ذکر شده، سینامالدئید به همراه ائوگنول، موثرترین ماده در برابر قارچ بوده است و این هم-افزایی ناشی از اتصالات دیواره سلول‌های قارچی و تخریب دیواره سلولی به اضافه اثر مهار رادیکال‌های آزاد بوده است. همچنین نتایج پژوهش‌های علمی نشان داده است که ترکیب یک ماده آنتی‌اکسیدان با یک ماده قارچ‌کش، ممکن است جایگزین بهتری برای از بین بردن قارچ‌های مولد پوسیدگی چوب نسبت به آنتی‌اکسیدان خالص باشد.

Hosseini Hashemi و همکاران (۲۰۱۶)، هم‌افزایی بین عصاره پوست درونی ساقه زرشک را همراه با آفت‌کش پروپیکونازول، کیلیت‌کننده[5] (لیگاند دو یا چند دندانه‌ای) فلز اتیلن دی آمین ترا استیک اسید[6] (EDTA) و آنتی‌اکسیدان هیدروکسی تولوئن بوتیل‌دار[7] (BHT) و مخلوط‌های آنها با یکدیگر را در برابر قارچ مولد پوسیدگی سفید رنگین‌کمان مورد ارزیابی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که عصاره پوست درونی ساقه زرشک به تنهایی خاصیت ضد قارچی نشان نداده است و خاصیت حفاظتی در ترکیب با پروپیکونازول بیشتر مشاهده شد. در بررسی اثر تیمار بر روی درصد بازدارندگی رشد قارچ رنگین‌کمان این طور نشان داده شده است که آفت‌کش پروپیکونازول، ۴۳/۶ درصد و آنتی‌اکسیدان BHT، ۵۴/۳ درصد در رشد قارچ ممانعت ایجاد کرده است، به طوری که در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر[8]، آنتی-اکسیدان BHT به میزان ۷۵ درصد از رشد قارچ جلوگیری کرده است. با مخلوط کردن BHT و پروپیکونازول، یک اثر هم‌افزایی یافته شد، به طوری که درصد بازدارندگی رشد قارچ در ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر به ۶۲ درصد رسید.

نظری و حسینی‌هاشمی (۱۳۹۶)، در بررسی آزمایشگاهی اثرات هم‌افزایی مخلوط‌های آفت‌کش‌های آلی، مواد کیلیت‌کننده فلز و آنتی‌اکسیدان در برابر قارچ مولد پوسیدگی سفید رنگین‌کمان دریافتند که آفت‌کش‌های پروپیکونازول، تبوکونازول و کلروتالونیل با افزودنی‌های غیر آفت‌کش EDTA و BHTاین‌طور یافته شد که بین آفت‌کش پروپیکونازول و کیلیت‌کننده فلز EDTA در غلظت بالا مانند ۴۵۰ میلی‌گرم بر لیتر اثر هم‌افزایی وجود داشته، اما در ترکیب با بقیه محلول‌ها، اثر هم‌افزایی یافته نشد. همچنین هیچگونه اثر هم‌افزایی بین آفت‌کش‌های تبوکونازول و کلروتالونیل با سایر محلول‌های حفاظتی یافت نشد.

آفت‌کش کلروتالونیل (۲، ۴، ۵، ۶- ترا کلرو ایزوفتالونیتریل) در ترکیب با گلوتاتیون (GSH) که

[1] Sinamaldehyde
[2] Catchine
[3] Quercetin
[4] Eugenol
[5] Metal Chelator
[6] Ethylenediaminetetraacetic Acid
[7] Butylated Hydroxytoluene
[8] ppm= part per million

یکی از آنتی‌اکسیدان‌های گیاهان، حیوانات، قارچ‌ها و بعضی از باکتری‌ها و موجودات تک سلولی می‌باشد، واکنش داده و از عملکرد آنزیم جلوگیری کرده و منجر به مرگ سلول می‌شود (Stirling & Temiz, 2014). این آفت‌کش به‌طور ابتدایی جهت کنترل کپک و باختگی مورد استفاده قرار گرفت. انحلال‌پذیری این ماده در حلال‌های متداول کم است و در فرمول‌بندی‌ها مشکل ایجاد می‌کند (Freeman *et al.*, 2006). اگرچه این ماده در برابر پوسیدگی قارچی (Creffield *et al.*, 1996) و موریانه‌ها (Grace *et al.*, 1993) موثر است، اما در مقادیر کمی برای حفاظت تعدادی از انواع چندسازه‌های چوبی مورد استفاده قرار گرفته است. آفت‌کش تبوکونازول در ترکیب با مس (II) در برابر قارچ‌های مخرب چوب، به‌ویژه قارچ‌های مقاوم در برابر مس اثر هم‌افزایی دارد (Williams *et al.*, 1996) و چنین ماده حفاظتی در بیشتر آزمایش‌ها مورد استفاده قرار گرفته است (Williams *et al.*, 1997; Williams *et al.*, 1999).

گزارش‌ها در مورد اثر متقابل و هم‌افزایی بین آفت‌کش‌های آلی و عصاره پوست درونی ساقه زرشک در برابر بیماری‌های قارچی اندک بوده و یا وجود ندارد. در این پژوهش، اثرات هم‌افزایی بین متداول‌ترین آفت‌کش‌ها (پروپیکونازول، تبوکونازول و کلروتالونیل) و عصاره پوست درونی ساقه زرشک در برابر قارچ مولد پوسیدگی سفید رنگین‌کمان مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

از منطقه سیاه بیشه مازندران، ساقه‌های تازه با قطرها و سنین متفاوت از یک پایه گیاه زرشک تهیه گردیدند و به‌منظور بررسی اصالت گیاه به هرباریوم دانشکده کشاورزی و منابع‌طبیعی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج انتقال داده شدند، به طوری که گونه *Berberis vulgaris* مورد تایید قرار گرفت. از ارتفاع ۲۰-۵۰ سانتی‌متری گیاه، پوست درونی (آندودرم) زرد رنگ مایل به سبز که به چوب ساقه چسبیده است (شکل ۱)، توسط چاقو از ساقه گیاه جدا شد و در هوای آزاد در زیر سایه تا رطوبت ۸ درصد خشک گردید.

شکل ۱. نمایی از پوست درونی (آندودرم) زرد رنگ مایل به سبز چسبیده به چوب ساقه گیاه زرشک

آفت‌کش‌ها و عصاره پوست درونی ساقه گیاه زرشک

آفت‌کش‌های پروپیکونازول (PCZ, SYNGENTA, Switzerland)، تبوکونازول (TEB, SIGMA-ALDRICH, USA)، کلروتالونیل (CTN, SIGMA-ALDRICH, USA) و عصاره آب- متانولی جداسازی شده توسط دکانتور کردن عصاره استونی استخراج شده از پوست درونی ساقه گیاه زرشک در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفتند.

آماده‌سازی عصاره گیاه زرشک

پوست درونی ساقه گیاه زرشک به قطعات کوچک تبدیل شد و سپس توسط آسیاب الکتریکی آزمایشگاهی به آرد پوست تبدیل گردید. آرد پوست از الک ۴۰ مش عبور داده شد و بر روی الک ۶۰ مش باقی ماند. از آرد پوست ۶۰ مش به میزان ۵۰ گرم در درون کارتوش ریخته شد و سپس به کمک دستگاه سوکسله و حلال استون به مدت ۸-۶ ساعت، استخراج مواد استخراجی (عصاره) بر طبق استاندارد TAPPI، T204 om-88 (۱۹۸۸) انجام شد.

حلال مواد استخراجی حاصل توسط دستگاه اواپوراتور (Heidolph Laborta 4001) با دمای آب ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه تبخیر گردید. سپس ماده استخراجی جمع‌آوری شده، توسط ماده سولفات سدیم خشک آب‌گیری شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌منظور ادامه آزمایش نگهداری شد. مقدار ماده استخراجی جامد به‌دست آمده ۲/۷۲ گرم بود. به میزان ۲ گرم از ماده به‌دست آمده در حلال‌های آب- متانول (1:1 *v/v*) حل و داخل دستگاه دکانتور ریخته شد، سپس ۵۰ میلی‌لیتر حلال ان- هگزان به آن اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه به‌صورت دستی تکان داده شد و این کار سه بار تکرار شد و در نهایت عصاره آب- متانولی برای آزمایش‌های بعدی جمع‌آوری گردید (Hosseini Hashemi *et al.*, 2015).

آماده‌سازی محلول‌های حفاظتی

به‌منظور مطالعه اثرات هم‌افزایی و فعالیت ضد قارچی محلول‌های حفاظتی به صورت جداگانه و ترکیبی در ۵ غلظت مختلف (۰/۰۵، ۰/۱۵، ۰/۲۵، ۰/۳۵ و ۰/۴۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) یعنی معادل ۵۰، ۱۵۰، ۲۵۰، ۳۵۰ و ۴۵۰ میلی‌گرم بر لیتر، محلول‌های حفاظتی تیمارهای مختلف ارایه شده در جدول ۱ آماده شدند.

جدول ۱. تیمار آفت‌کش‌ها و عصاره پوست درونی ساقه زرشک با غلظت‌های مختلف

تیمار	کد	غلظت (ppm) (میلی‌گرم بر لیتر)				
پروپیکونازول	PCZ	۵۰	۱۵۰	۲۵۰	۳۵۰	۴۵۰
تبوکونازول	TEB	۵۰	۱۵۰	۲۵۰	۳۵۰	۴۵۰
کلروتالونیل	CTN	۵۰	۱۵۰	۲۵۰	۳۵۰	۴۵۰
عصاره پوست درونی ساقه زرشک	Ex	۵۰	۱۵۰	۲۵۰	۳۵۰	۴۵۰
پروپیکونازول + عصاره پوست درونی ساقه زرشک	PCZ + Ex	۵۰	۱۵۰	۲۵۰	۳۵۰	۴۵۰
تبوکونازول + عصاره پوست درونی ساقه زرشک	TEB + Ex	۵۰	۱۵۰	۲۵۰	۳۵۰	۴۵۰
کلروتالونیل + عصاره پوست درونی ساقه زرشک	CTN + Ex	۵۰	۱۵۰	۲۵۰	۳۵۰	۴۵۰

برای تهیه استوک غلظت‌های مورد نظر، از روش زیر استفاده شد: به‌عنوان مثال، برای تهیه ۵۰ میلی‌لیتر عصاره پوست درونی ساقه زرشک با غلظت ۴۵۰ میلی‌گرم بر لیتر توسط حلال آب مقطر:

۴۵۰ mg/Lit ۱۰۰۰ mL

X=? ۵۰ mL X=۲۲/۵ mg

مقدار ۲۲/۵ میلی‌گرم از پودر عصاره پوست درونی ساقه زرشک را در ۵۰ میلی‌لیتر حلال آب مقطر حل کرده و بدین ترتیب استوک ۴۵۰ میلی‌گرم بر لیتر عصاره پوست درونی ساقه زرشک تهیه گردید.

به علت مایع بودن آفت‌کش‌های پروپیکونازول و تبوکونازول، تهیه استوک آنها با روش دیگری انجام گرفت، به‌طوری‌که از عدد مقدار ماده موثره درج شده بر روی ظرف حاوی آفت‌کش استفاده گردید. به‌عنوان مثال برای تهیه ۱۲ میلی‌لیتر استوک آفت‌کش تبوکونازول (شکل ۲) با غلظت ۴۵۰ میلی‌گرم بر لیتر، از فرمول زیر استفاده گردید:

۴۵۰ mg/Lit ۱۰۰۰ mL

X=? ۱۲ mL X=۵/۴ mg = ۰/۰۰۵۴ gr

مقدار ماده موثره درج شده بر روی ظرف حاوی آفت‌کش تبوکونازول برابر ۶۰ گرم بر کیلوگرم می‌باشد. با عنایت به اینکه حلال ماده آفت‌کش نامشخص است، حلال مورد نظر، آب فرض گردید. از آن جایی که چگالی آب، ۱ گرم بر سانتی‌متر مکعب می‌باشد، هر لیتر آب، به‌طور تقریبی برابر با یک کیلوگرم آب ۴ درجه سانتی‌گراد در فشار ۷۶۰ میلی‌متر جیوه می‌باشد.

۶۰ gr ۱۰۰۰ mL

۰/۰۰۵۴ gr X=? ⟶

X= ۰/۰۹ mL ۰/۰۹×۱۰۰۰= ۹۰ µlit

به میزان ۹۰ میکرولیتر از آفت‌کش مایع تبوکونازول را در ۱۲ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده تا استوک تبوکونازول با غلظت ۴۵۰ میلی‌گرم بر لیتر تهیه گردد.

برای تهیه ۱۲ میلی‌لیتر استوک آفت‌کش پروپیکونازول با غلظت ۴۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نیز از روش زیر استفاده شد:

۴۵۰ mg/Lit ۱۰۰۰ mL

X=? ۱۲ mL X=۵/۴ mg = ۰/۰۰۵۴ gr

مقدار ماده موثره درج شده بر روی ظرف حاوی آفت‌کش تبوکونازول برابر ۲۵۰ گرم بر کیلوگرم می‌باشد.

۲۵۰ gr ۱۰۰۰ gr

۰/۰۰۵۴ gr X=? ⟶

X= m= ۰/۰۲۱۶ gr

به علت مایع بودن آفت‌کش پروپیکونازول و به واسطه داشتن چگالی (چگالی (d) پروپیکونازول در حدود ۱/۲۹ گرم بر سانتی‌متر مکعب می‌باشد)، از رابطه (۱) برای محاسبه میزان استوک این آفت‌کش استفاده شد:

رابطه (۱)

$d = m/V \longrightarrow V = m/d$

$V = ۰/۰۲۱۶ \div ۱/۲۹ = ۰/۰۱۶۷$ mL

۰/۰۱۶۷×۱۰۰۰= ۱۶/۷۴ µlit

مقدار ۱۶/۷۴ میکرولیتر از آفت‌کش مایع پروپیکونازول را در ۱۲ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده تا استوک پروپیکونازول با غلظت ۴۵۰ میلی‌گرم بر لیتر به‌دست آید. برای تهیه تیمار عصاره با غلظت‌های کمتر (۵۰، ۱۵۰، ۲۵۰ و ۳۵۰ میلی‌گرم بر لیتر)، یا به عنوان مثال برای تهیه ۲ میلی‌لیتر عصاره با غلظت ۳۵۰ میلی‌گرم بر لیتر از رابطه (۲) استفاده شد:

رابطه (۲)

$M_1V_1 = M_2V_2$

$۴۵۰ \text{ ppm} \times V_1 = ۳۵۰ \text{ ppm} \times ۲ \text{ mL}$

$V_1 = ۱/۵۵$ mL ۱/۵۵× ۱۰۰۰= ۱۵۵۰ µL

مقدار ۱۵۵۰ میکرولیتر از استوک عصاره با غلظت ۴۵۰ میلی‌گرم بر لیتر را برداشته و به کمک آب مقطر به حجم ۲ میلی‌لیتر رسانده تا استوک عصاره با غلظت ۳۵۰ میلی‌گرم بر لیتر تهیه گردد.

برای تهیه تیمارهای ترکیبی، ابتدا تمامی استوک‌های مورد نظر تهیه شدند و سپس با استفاده از رابطه (۲)، برای هر یک از تیمارها با غلظت‌های

مختلف به میزان ۲ میلی‌لیتر محلول حفاظتی برای ادامه آزمون آماده گردید.

شکل ۲. استوک‌های تبوکونازول با ۵ غلظت مختلف

ارزیابی فعالیت ضد قارچی

روش انتشار[1]

به‌منظور ارزیابی سمیت عصاره آب- متانولی و آفت‌کش‌ها به صورت جداگانه و ترکیبی، محلول‌های حفاظتی آماده شده از فیلتر سر سرنگی ۰/۴۵ میکرون Microsolve عبور داده و در داخل شیشه پنی‌سیلین ریخته شد.

محیط کشت مالت اکستراکت آگار آماده شده با نسبت ۴۸ گرم بر لیتر در داخل اتوکلاو مرطوب با دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۲-۱ اتمسفر استریل گردید.

حدود ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت آماده شده در داخل هر یک از پتریدیش‌ها ریخته شد و بر طبق روش اصلاح شده استاندارد CLSI (CLSI, 2008)[2]، ۳ دیسک آنتی‌بیوگرام با موقعیت مثلثی شکل بر روی محیط کشت‌های خنک شده قرار داده شد.

به کمک نمونه‌بردار[3] به میزان ۲۰ میکرولیتر از محلول‌های حفاظتی از قبل آماده شده بر روی دیسک‌های آنتی‌بیوگرام ریخته شد. ۵ غلظت (۵۰، ۱۵۰، ۲۵۰، ۳۵۰ و ۴۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) از محلول‌های حفاظتی مورد آزمون قرار گرفت و برای هر غلظت، از ۳ دیسک آنتی‌بیوگرام و یک پتریدیش استفاده گردید.

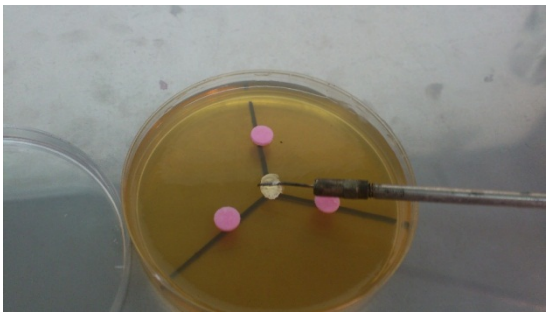
در مجموع، ۳۵ پتریدیش و ۱۰۵ دیسک آنتی‌بیوگرام در این آزمون آزمایشگاهی (بر طبق روش انتشار ماده حفاظتی توسط دیسک کاغذی آنتی بیوگرام بر روی آگار[4]) مورد استفاده قرار گرفت (Heatley, 1944) (شکل ۳).

قارچ مولد پوسیدگی سفید رنگین‌کمان خالص‌سازی شده از موسسه البرز واقع در مرکز تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور تهیه گردید. قارچ مورد نظر برای انجام کارهای بعدی در محیط آزمایشگاه تکثیر شد.

حدود ۵ میلی‌متر از پلاگ میسیلیوم قارچ در مرکز پتریدیش‌های حاوی محیط کشت خنک شده در زیر هود لامینار قرار داده شد.

پتریدیش‌های آلوده به قارچ به انکوباتور با دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد و ۷۵ درصد رطوبت نسبی انتقال داده شدند.

[1] Diffusion Method
[2] Clinical and Laboratory Standards Institute
[3] Sampeler
[4] Agar-disk Diffusion



شکل ۳. روش agar-plate diffusion **به‌منظور ارزیابی فعالیت ضد قارچی محلول‌های حفاظتی مختلف در برابر قارچ رنگین‌کمان**

برای هر تیمار، ۳ دیسک آنتی‌بیوگرام به‌عنوان تکرار مورد استفاده قرار گرفت. قارچ در ۳ پتریدیش حاوی محیط کشت بدون محلول‌های حفاظتی به عنوان شاهد نیز رشد کرد.

رشد قارچ روزانه مشاهده شد و درصد نواحی پوشش داده شده توسط میسلیوم در پشت پتریدیش‌ها توسط ماژیک CD مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. درصد رشد قارچ در برابر هر یک از محلول‌های حفاظتی توسط خط‌کش میلی‌متری اندازه‌گیری شد و سطح سمیت برای غلظت‌های مختلف با بازدارنگی رشد قارچ بر طبق روش Hosseini Hashemi و Jahan Latibari (۲۰۱۱) مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. رشد قارچ (قطر کولونی) مورد اندازه‌گیری قرار گرفت و درصد بازدارندگی رشد قارچ بر طبق فرمول زیر محاسبه شد (Hosseini Hashemi *et al.*, 2016):

رابطه (۳) درصد بازدارندگی رشد قارچ = $[(C\text{-}T)/C] \times 100$

به طوری که C، قطر کولونی شاهد (میلی‌متر) و T، قطر کولونی پتریدیش مورد آزمون (میلی‌متر) می‌باشد (Begum *et al.*, 2010) (شکل ۴).

شکل ۴. رشد میسلیوم قارچ رنگین‌کمان در محیط کشت حاوی دیسک‌های آنتی‌بیوگرام بدون محلول حفاظتی (شاهد، پایین) و با محلول حفاظتی (پروپیکونازول + عصاره پوست درونی ساقه زرشک، بالا)

آنالیز آماری

درصد بازدارندگی رشد قارچ رنگین‌کمان مورد محاسبه قرار گرفت و نتایج به‌دست آمده در قالب طرح کامل تصادفی با استفاده از آزمایش‌های فاکتوریل با دو متغیر به کمک آزمون دانکن و تکنیک تجزیه واریانس مورد تحلیل قرار گرفت. بدین ترتیب تاثیر مستقل و متقابل هر یک از عوامل متغیر بر خواص مورد مطالعه در سطح اعتماد ۵ درصد بررسی شد.

نتایج

داده‌های حاصل از اندازه‌گیری درصد بازدارندگی رشد قارچ رنگین‌کمان به‌منظور بررسی تاثیر نوع تیمار و غلظت محلول‌های حفاظتی بر روی درصد

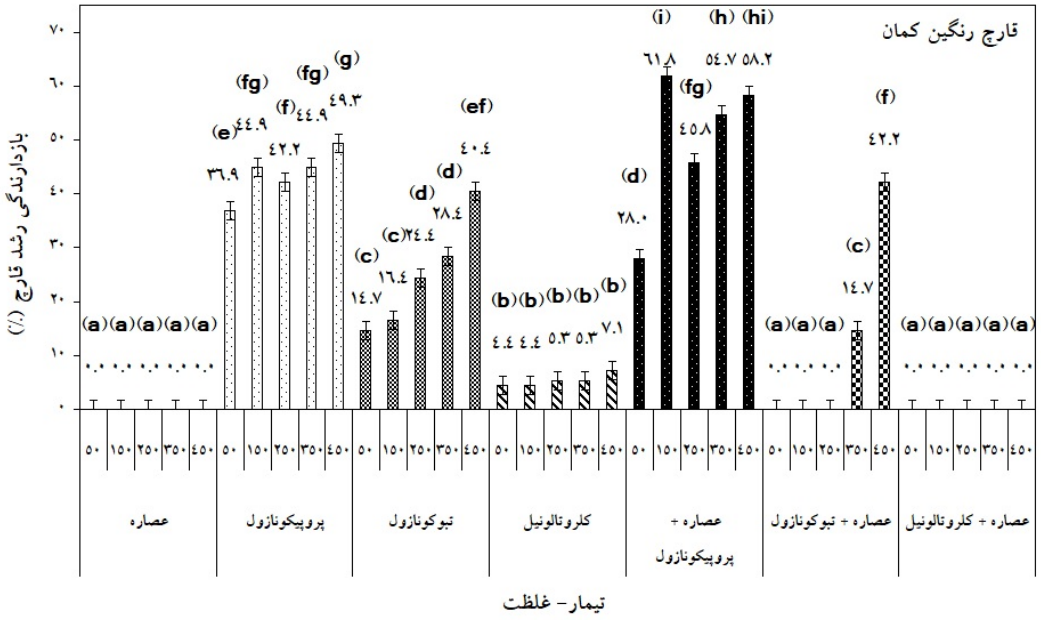
بازدارندگی رشد قارچ در جدول ۲ نشان داده شده است، به طوری که تاثیر مستقل و متقابل نوع تیمار و غلظت محلول‌های حفاظتی بر درصد بازدارندگی رشد قارچ در سطح اعتماد ۵ درصد معنی‌دار بود.

جدول ۲. تجزیه واریانس فاکتوریل دو عاملی تاثیر هم‌افزایی آفت‌کش‌های آلی با عصاره پوست درونی ساقه زرشک و غلظت آنها بر درصد بازدارندگی رشد قارچ رنگین‌کمان

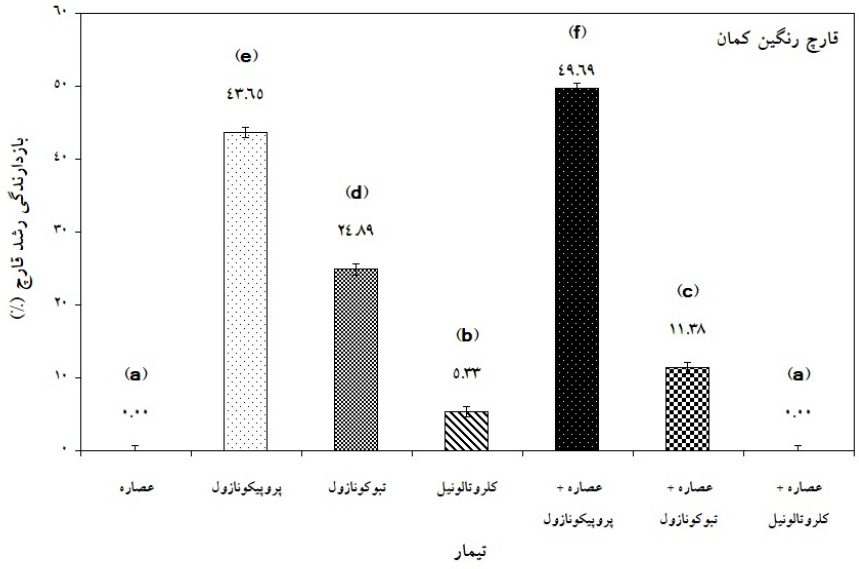
منبع تغییرات	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدار F	سطح معنی‌داری
تیمار (A)	۳۸۲۵۳/۷۲۶	۶	۶۳۷۵/۶۲۱	۷۵۱/۷۷۴	۰/۰۰۰
غلظت (B)	۳۰۰۲/۹۸۵	۴	۷۵۰/۷۴۶	۸۸/۵۲۳	۰/۰۰۰
اثر متقابل (A×B)	۴۷۹۲/۱۰۰	۲۴	۱۹۹/۶۷۱	۲۳/۵۴۴	۰/۰۰۰
خطای آزمایش	۵۹۳/۶۵۴	۷۰	۸/۴۸۱		
کل	۴۶۶۴۲/۴۶۵	۱۰۴			

طبقه‌بندی مشاهده‌های مربوط به بررسی میزان معنی‌دار بودن درصد بازدارندگی رشد قارچ با استفاده از روش دانکن انجام شد. نتایج محاسبات آماری و گروه‌بندی میانگین‌ها در شکل‌های ۵، ۶ و ۷ آمده است. بیشترین میزان درصد بازدارندگی رشد قارچ (۶۱/۸ درصد) مربوط به تیمار محلول حفاظتی عصاره پوست درونی ساقه زرشک + پروپیکونازول و غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر بود. کمترین میزان درصد بازدارندگی رشد قارچ (صفر درصد) مربوط به تیمارهای محلول حفاظتی عصاره پوست درونی زرشک در تمام غلظت‌ها، عصاره پوست درونی ساقه زرشک + کلروتالونیل در تمام غلظت‌ها و عصاره پوست درونی ساقه زرشک + تبوکونازول در غلظت‌های ۵۰، ۱۵۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر بوده است (شکل ۵). تفاوت معنی‌داری بین مقدار درصد بازدارندگی رشد قارچ توسط تیمارهای پروپیکونازول با تمام غلظت‌ها، تبوکونازول با تمام غلظت‌ها، عصاره پوست درونی ساقه زرشک + پروپیکونازول با تمام غلظت‌ها و عصاره پوست درونی ساقه زرشک + تبوکونازول فقط در غلظت‌های ۳۵۰ و ۴۵۰ میلی‌گرم بر لیتر در سطح ۵ درصد وجود داشت، در حالی که بین مقدار درصد بازدارندگی رشد قارچ توسط آفت-کش کلروتالونیل (۷/۱-۴/۴ درصد) به تنهایی در تمامی غلظت‌ها، در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (شکل ۶).

بعضی از عصاره‌های استخراج شده از پوست درونی ساقه گیاه زرشک و نیز گیاهان مختلف، پتانسیل فعالیت ضد میکروبی را در برابر موجودات بیماری‌زا از خود نشان می‌دهند که ناشی از وجود ترکیبات فعال زیستی نظیر ترپنوییدها، آلکالوییدها و فنول‌ها می‌باشد (Hosseini Hashemi *et al.*, 2015; Dikeman *et al*. 2005).

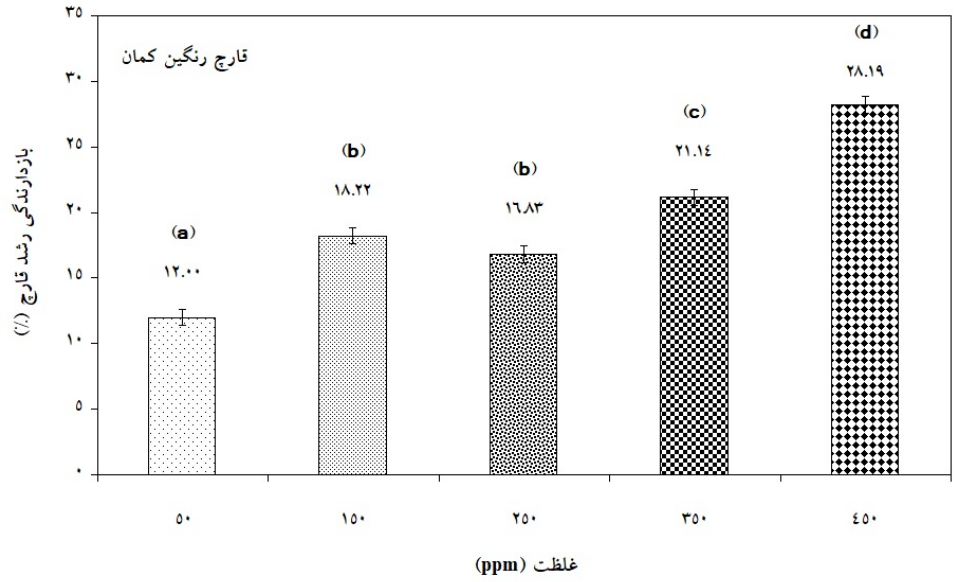


شکل ۵. اثر متقابل آفت‌کش‌های آلی با عصاره پوست درونی ساقه زرشک و غلظت آنها بر درصد بازدارندگی رشد قارچ رنگین‌کمان (حروف الفبای متفاوت نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری بین تیمارها و غلظت‌ها وجود دارد)



شکل ۶. مقایسه تاثیر مستقل آفت‌کش‌های آلی و عصاره پوست درونی ساقه زرشک بر درصد بازدارندگی رشد قارچ رنگین‌کمان (حروف الفبای متفاوت نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری بین تیمارها وجود دارد)

در تاثیر مستقل تیمار محلول‌های حفاظتی، تفاوت معنی‌داری بین مقدار درصد بازدارندگی رشد قارچ توسط کلیه تیمارها وجود داشته است، در حالی که تفاوت معنی‌داری بین مقدار درصد بازدارندگی رشد قارچ در تیمارهای عصاره پوست درونی ساقه زرشک و عصاره پوست درونی ساقه زرشک + کلروتالونیل مشاهده نشده است.



شکل ۷. مقایسه تاثیر مستقل غلظت آفت‌کش‌های آلی و عصاره پوست درونی ساقه زرشک بر درصد بازدارندگی رشد قارچ رنگین‌کمان (حروف الفبای متفاوت نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌ها وجود دارد)

در تاثیر مستقل غلظت محلول‌های حفاظتی، اختلاف معنی‌داری نیز بین مقدار درصد بازدارندگی رشد قارچ در غلظت‌های ۵۰، ۱۵۰، ۲۵۰، ۳۵۰ و ۴۵۰ میلی‌گرم بر لیتر در سطح ۵ درصد وجود دارد، اما بین غلظت‌های ۱۵۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر، اختلاف معنی‌دار وجود ندارد (شکل ۷).

بحث و نتیجه‌گیری

در اندام‌های مختلف گیاه زرشک و همچنین عصاره پوست درونی ساقه زرشک، آلکالوییدهایی به نام ایزوکینولین وجود دارد که دارای رنگ زرد روشن می‌باشد و از مشتقات این ترکیب، ان- متیل-۴- (O- هیدروکسی بنزیل)-۱، ۲، ۳، ۴- تترا هیدرو ایزوکینولین به میزان ۲۸/۸۲ درصد و بربرین در پوست درونی زرشک یافت شده است (Hosseini Hashemi *et al*, 2015; Kulkarni & Dhir, 2010). بربرین (BER) ماده‌ای است که به‌طور قابل توجهی از رشد گونه‌های مخمر *Candida albicans* در طیف وسیعی جلوگیری کرده است (Park *et al.*, 1999; Bian *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2001). فلوکونازول به تنهایی هیچ اثری در برابر مخمر مورد نظر ندارد، اما با ترکیب ماده بربرین و آفت‌کش فلوکونازول، یک اثر هم‌افزایی در برابر مخمر *C. albicans* یافته شده است (Iwazaki *et al.*, 2009; Quan *et al.*, 2006).

آزول‌ها، آفت‌کش‌هایی هستند که برای درمان عفونت‌های قارچی انسان به‌کار برده می‌شوند و فعالیت‌های ضد قارچی هم‌افزایی آنها با عوامل دیگر به صورت ترکیبی (Shrestha *et al.*, 2015) و برای حفاظت نمونه‌های چوبی در تماس با خاک و بالای زمین (Schultz & Nicholas, 2003) به اثبات رسیده است.

آفت‌کش پروپیکونازول یک ماده ضدقارچی مناسبی بوده که به‌منظور حفاظت چوب در برابر قارچ رنگین‌کمان مورد استفاده قرار گرفته است (Buschhaus & Valcke, 1995). این ماده در ترکیب با آفت‌کش تبوکونازول دارای اثر هم‌افزایی در برابر رشد قارچ رنگین‌کمان نیز بوده است، به طوری که با حضور پروپیکونازول، آنزیم‌های کیتاناز، در شروع

تشکیل کولونی قارچی دچار مشکل می‌شوند (Buschhaus & Valcke, 1995).

Abioye و همکاران (۲۰۱۷) در بررسی اثر هم-افزایی و ویژگی‌های ضدمیکروبی عصاره ان- هگزانی و روغن ضروری حاصل از گیاه *Parkia biglobosa* در ترکیب با آنتی‌بیوتیک‌های انتخابی از جمله استرپتومایسین، آنالیز رسوبات پروتئین و آزمون طیف‌سنجی زیر قرمز فوریه[1] را انجام دادند و دریافتند که دامنه رسوبات پروتئینی حاصل از سلول‌های باکتری‌های انتخابی افزایش یافته است (Akinpelu *et al.*, 2008; Oloke, 1989) و وجود گروه‌های فنولی، ترکیبات فنولی و حلقه آروماتیک در جزء ان- هگزان، این پدیده را مورد تایید قرار داده است. همچنین نتایج رسوب پروتئین به‌دست آمده در آزمایش هم‌افزایی نشان داد که مکانیسم‌های عمل عوامل ضدمیکروبی مختلف در آزمایش ترکیبی، می‌تواند ناشی از خسارت یا اختلال در غشاء سلولی باشد که به نوبه خود منجر به رسوب محتویات سلولی می‌گردد. رسوب محتویات سلولی در اثر عوامل ضدباکتریایی بعضی از ترکیبات فعال زیستی گیاهان نیز توسط Akinpelu و همکاران (۲۰۱۵) و Aiyegoro و همکاران (۲۰۰۷) گزارش داده شده است. اگرچه گزارش داده شده است که استرپتومایسین سبب بدخوانی پروتئین[2] در فرآیند انتقال سلولی می‌گردد، در نتیجه به علت مشارکت بدخوانی پروتئین در غشاء سلولی، کانال‌های غیرطبیعی تشکیل می‌گردد (Davis *et al.*, 1986). چنین کانال‌های غیرطبیعی می‌توانند منجر به هجوم و تجمع غلظت موثر عوامل ضدباکتریایی در سلول‌های باکتریایی شده و اثرات ضدباکتریایی و سکون باکتریایی را ایجاد کنند. بنابراین با ترکیب توانایی اختلال در غشاء سلولی و تشکیل کانال‌های غیرطبیعی توسط استرپتومایسین، اثرات هم‌افزایی مخلوط جزء ان- هگزان حاصل از عصاره پوست گیاه *P. biglobosa* با استرپتومایسین بر موجودات مورد آزمون تشریح خواهد شد. به‌طور کلی می‌توان اذعان داشت که غشاء سلول‌های قارچ رنگین‌کمان نیز ممکن است به واسطه اثر ترکیبی عصاره آب- متانولی پوست درونی ساقه زرشک با آفت‌کش پروپیکونازول تحت تاثیر چنین فرآیندی قرار گیرد.

[1] FTIR
[2] Protein misread

منابع

کافی، م. و بالندری، الف. (۱۳۸۱) فناوری تولید و فرآوری زرشک. موسسه چاپ و انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ۲۱۰ صفحه.

نظری، ل. و حسینی‌هاشمی، س.خ. (۱۳۹۶) بررسی آزمایشگاهی اثرات هم‌افزایی (سینرژیک) مخلوط‌های آفت‌کش‌های آلی، مواد کیلیت‌کننده فلز و آنتی‌اکسیدان در برابر قارچ مولد پوسیدگی سفید رنگین‌کمان. فصلنامه علمی- پژوهشی تحقیقات علوم چوب و کاغذ ایران، ۳۲(۲): ۴۵۴-۴۴۰.

Abioye, O.E., Akinpelu, D.A. and Okoh, A.I. (2017) Synergistic effects of n-hexane fraction of *Parkia biglobosa* (Jacq.) bark extract and selected antibiotics on bacterial isolates. Sustainability, 9(2): 228-228.

Aiyegoro, O.A., Akinpelu, D.A. and Okoh, A.I. (2007) In vitro potentials of the stem bark of red water tree (*Erythrophyleum suaveolens*). Journal of Biological Sciences, 7(7): 1233-1238.

Akinpelu, D.A., Aiyegoro, O.A. and Okoh, A.I. (2008) In vitro antimicrobial and phytochemical properties of extract of stem bark of *Afzelia africana* (Smith). African Journal of Biotechnology, 7(20): 3665-3670.

Akinpelu, D.A., Alayande, K.A., Aiyegoro, O.A., Akinpelu, O.F. and Okoh, A.I. (2015) Probable mechanisms of biocidal action of *Cocos nucifera* Husk extract and fractions on bacteria isolates. BMC Complementary and Alternative Medicine, 15(116): 116-116.

Begum, M.F., Mahal, M.F. and Alam, M.S. (2010) Inhibition of spore germination

Grace, J.K., Laks, P.E. and Yamamoto, R.T. (1993) Efficacy of chlorothalonil as a wood preservative against the Formosan subterranean termite. Forest Product Journal, 43(1): 21-24.

Green III, F. and Schultz, T.P. (2003) New environmentally-benign concept in wood protection: The combination of organic biocides and non-biocidal additives. In: *Wood Deterioration and Preservation*, ACS Symposium Series No. 845. B. Goodell, D.D. Nicholas and T.P. Schultz, (Eds.). American Chemical Society, Washington, DC, pp. 378-389.

Heatley, N.G. (1944) A method for the assay of penicillin. Biochemical Journal, 38(1): 61-65.

Hosseini Hashemi, S.K. and Jahan Latibari, A. (2011) Evaluation and identification of walnut heartwood extractives for protection of poplar wood. BioResources, 6(1): 59-69.

Hosseinihashemi, S.K., Anooshei, H., Aghajani, H. and Salem, M.Z.M. (2015) Chemical composition and antioxidant activity of extracts from the inner bark of *Berberis vulgaris* stem. BioResources, 10(4): 7958-7969.

Hosseinihashemi, S.K., Nazari, L., Lashgari, A. and Salem, M.Z.M. (2016) Evaluation of inner bark extract of barberry stem and its synergy with propiconazole, EDTA, BHT, and their combinations against the white-rot fungus *Trametes versicolor*. BioResources, 11(1): 1505-1517.

Hwang, W.J., Kartal, S.N., Yoshimura, T. and Imamura, Y. (2006) Synergistic effect of heartwood extractives and quaternary ammonium compound on termite resistance of treated wood. Pest Management Science, 63(1): 90-95.

Iwazaki, R.S., Endo, E.H., Ueda-Nakamura, T., Nakamura, C.V., Garcia, L.B. and Filho, B.P. (2009) *In vitro* antifungal activity of the berberine and its synergism with fluconazole. Antonie Van Leeuwenhoek, 97(2): 201-205.

Kamdem, D.P. and Nzokou, P. (2002) Evolution of extractives from African Padauk (*Peterocarpus soyauxii* Taub.) for pretection of Non decay resistant species. 33th Annual Meeting, Cardiff, South Wales, UK. No. IRG/WP/02-10419. International Research Group on Wood Preservation, Stockholm, Sweden.

and mycelial growth of three fruit rot pathogens using some chemical fungicides and botanical extracts. Journal of Life Earth Science, 5(2010): 23-27.

Bian, X., He, L. and Yang, G. (2006) Synthesis and antihyperglycemic evaluation of various protoberberine derivatives. Bioorganic and Medicinal Chemistry Lettres, 16(5): 1380-1383.

Buschhaus, H.U. and Valcke, A.R. (1995) Triazoles: Synergism between propiconazole and tebuconazole. IRG/WP 95-30092, International Research Group on Wood Protection, Helsingør, Denmark.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2008). Document M31-A3: Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Approved Standard, Third Edition. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA.

Creffield, J.W., Woods, T.L. and Chew, N. (1996) In-ground performance of two formulations of chlorothalonil after five years of exposure at three test sites in Australia. International Research Group on Wood Preservation, Doc. No. IRG/WP/96-30101.

Davis, B.D., Chen, L. and Tai, P.C. (1986) Misread protein creates membrane channels: An essential step in the bacterial action of aminoglycosides. Proceeding of National Academy of Sciences of the USA, 83(16): 6164-6168.

Dikeman, C.L., Bauer, L.L., Flickinger, E.A. and Fahey, G.C. (2005) Effects of stage of maturity and cooling on the chemical composition of selected mushroom varieties. Journal of Agriculture and Food chemistry, 53(2005): 1130-1138.

Freeman, M.H., Nicholas, D.D. and Schultz, T.P. (2006) In environmental impacts of treated wood. In: T.G. Townsend and H. Solo-Gabriele (Eds.). Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL, pp. 19-36.

Goodell, B., Nicholas, D.D. and Schultz, T.P. (2003) Wood deterioration and preservation. ACS Symposium Series No. 845, (Eds.). American Chemical Society, Washington, DC, pp. 378-389.

albicans resistant to fluconazole. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 50(3): 1096-1099.

Saeed, A., Najma, S. and Saima S. (2007) The beriberi's story: *Berberis vulgaris* in therapeutics. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, 20(2007): 83-92.

Schultz, T.P. and Nicholas, D.D. (2003) A brief overview on non-arsenical wood preservative systems. In: B. Goodell, D. Nicholas and T. Schultz, (Eds.). Wood Deterioration and Preservation, ACS Symposium Series No. 845, American Chemical Society, Washington, DC: pp. 378-389.

Shrestha, S.K., Fosso, M.Y. and Garneau-Tsodikova, S. (2015) A combination approach to treating fungal infections. Scientific Reports, 5: 17070.

Stirling, R. and Temiz, A. (2014) Fungicides and insecticides used in wood preservation. In: T.P. Schultz, B. Goodell and D.D. Nicholas (Eds.). Deterioration and protection of sustainable biomaterials, American Chemical Society Books, Washington, DC.

Williams, G., Cornfield, J.A., Brown, J. and Rayn, N.P. (1996) U.S. Patent 5,527,384.

Williams, G., Cornfield, J.A., Brown, J. and Rayn, N.P. (1997) U.S. Patent 5,634,967.

Williams, G., Cornfield, J.A., Brown, J. and Rayn, N.P. (1999) U.S. Patent 5,916,356.

Yen, T.B. and Chang, S.T. (2008) Synergistic effect of cinnamaldehyde in combination with eugenol against wood decay fungi. Bioresource Technology, 99(1): 232-236.

Kulkarni, S.K. and Dhir, A. (2010) Berberine: A plant alkaloid with therapeutic potential for central nervous system disorders. Phytotherapy Research, 24(3): 317-324.

Lei, G., Dan, H., Jinhua, L., Wei, Y., Song, G. and Li, W. (2011) Berberine and Itraconazole are not synergistic *in vitro* against *Aspergillus fumigatus* isolated from clinical patient. Molecules, 16(11): 9218-9233.

Liu, C.X., Xiao, P.G. and Liu, G.S. (1991) Studies on plant resources, pharmacology and clinical treatment with berbamine. Phytotherapy Research, 5(1991): 228-230.

Oloke, J.K. (1989) The antibacterial and antifungal effect of the volatile oil and partially purified extracts of *Aframomum melegueta* K. Schum. (Ph.D. Dissertation), Department of Microbiology, University of Ife, Ile-Ife, Nigeria.

Park, K.S., Kang, K.C., Kim, J.H., Adams, D.J., Johng, T.N. and Paik, Y.K. (1999) Differential inhibitory effects of protoberberines on sterol and chitin biosyntheses in *Candida albicans*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 43(5): 667-674.

Park, K.S., Kang, K.C., Kim, K.Y., Jeong, P.Y., Kim, J.H., Adams, D.J. and Paik, Y.K. (2001) HWY-289, a novel semi-synthetic protoberberine derivative with multiple target sites in *Candida albicans*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 47(5): 513-519.

Quan, H., Cao, Y.Y., Xu, Z., Zhao, J.X., Gao, P.H., Qin, X.F. and Jiang, Y.Y. (2006) Potent in vitro synergism of fluconazole and berberine chloride against clinical isolates of *Candida*

Synergistic Antifungal Effects of Organic Pesticides and Extract from the Inner Bark of Barberry (*Berberis vulgaris*) Stem on the White -rot Fungus

Latif Nazari[1] and Seyyed Khalil Hosseinihashemi[2]*

1) Graduate of M.Sc., Department of Wood and Paper Science and Technology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.
2) Associate Professor, Department of Wood and Paper Science and Technology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran. *Corresponding Author Email Address: hashemi@kiau.ac.ir.

Date of Submission: 2016/06/19 Date of Acceptance: 2017/01/30

Abstract

In this research, the dependent and interaction effects of three organic pesticides (Propiconazole, Tebuconazole, and Chlorothalonile) and water-methanol extract of inner bark (endoderm) of barberry stem with different concentrations (50, 150, 250, 350, and 450 ppm) was investigated on the white-root fungus of *Rainbow (Trametes versicolor)*. The tests were done in the *in vitro* and using malt-extract agar culture and agar-disk diffusion method (modified method of CLSI standard (2008)). The plates were placed inside the incubator at 23 °C and 75% relative humidity for one week. In addition, the growth of mycelium fungus and inhibition effects of different preservative solutions against fungus was also measured daily for one week. The results demonstrated that inner bark extract of barberry stem and chlorothalonil pesticide did not alone have any inhibition effect on the growth of fungus, while the propiconazole and tebuconazole pesticides alone had a significant effect on the growth of fungus in various concentrations. In the study of the combined effects of preservative solutions showed that tebuconazole at the 450 ppm concentration and propiconazole at all of mentioned concentrations along with inner bark extract of barberry stem could prevent to the extent acceptable from the fungus growth. It can conclude that the propiconazole and tebuconazole pesticides along with the extract of the inner bark of barberry create a synergistic effect in preventing the growth of tested fungus.

Keywords: Inner bark extract of barberry stem; Organic pesticide; Rainbow fungus; Synergistic effects.