



Research Article

Effect of *Salvia mirzayanii* and *Mentha piperita* essential oils on toxigenicity and aflatoxin gene expression in *Aspergillus flavus*

Sedigheh Mohammadi[✉], Zahra Roosefid

Department of Plant Pathology, Faculty of Agricultural Sciences and New Technologies, Islamic Azad University Shiraz Branch, Shiraz, Iran

Abstract

Aflatoxins are toxic metabolites produced by certain *Aspergillus* species. They cause disease and contaminate food, so reducing and controlling these toxins is extremely important. Due to their antifungal properties, essential oils and extracts from medicinal plants are increasingly used. As part of this study, the medicinal plants *Salvia mirzayanii* and *Mentha piperita* were harvested from their original habitat in Hormozgan Province and essential oils were extracted. Subsequently, the toxin-producing fungus *A. flavus* was isolated and purified from maize kernels, and the effect of the essential oil of both plants on the toxigenicity of *A. flavus* and the expression of the aflatoxin-encoding gene was investigated using real-time PCR. The antifungal properties were assessed using the disk diffusion method and a mixed evaluation, and then the effective concentration of the essential oil in both plants was determined. The essential oils of both plants effectively inhibited the growth of *A. flavus* at concentrations of 1000 and 2000 ppm. However, peppermint essential oil significantly reduced toxin production and had a stronger effect on the expression of the gene encoding aflatoxin at a concentration of 2000 ppm. Considering the effectiveness of peppermint essential oil at a concentration of 2000 ppm on the expression of the gene encoding aflatoxin, this essential oil can be introduced as a biological and safe method for the biological control of aflatoxin.

Keywords: *Aspergillus flavus*, Corn, Bio control, Realtime-PCR

[✉] Corresponding author: Mohammadi.pp@gmail.com, Received:2024.08.22; Revised: 2024.10.02; Accepted: 2024.10.08

مقاله پژوهشی

تأثیر اسانس‌های مروتلخ و نعناع‌فللی بر توکسین‌زایی و

بیان ژن آفلاتوکسین در *Aspergillus flavus*

صدیقه محمدی[✉]، زهرا روسفید

گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده علوم کشاورزی و فناوری های نوین، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز، شیراز، ایران

چکیده

آفلاتوکسین‌ها متابولیت‌های سمی تولید شده توسط گونه‌های *Aspergillus* هستند که باعث آلودگی مواد غذایی می‌شوند. کنترل این سموم اهمیت زیادی دارد. استفاده از اسانس‌های گیاهان دارویی به دلیل خواص ضد قارچی در حال گسترش است. در این پژوهش، اسانس‌های مروتلخ و نعناع‌فللی از گیاهان برداشت شده در استان هرمزگان استخراج شدند. قارچ *Aspergillus flavus* مولد توکسین از دانه ذرت جدا و خالص‌سازی شد. تأثیر اسانس‌ها بر توکسین‌زایی و بیان ژن آفلاتوکسین با Realtime PCR بررسی شد. خاصیت ضدقارچی با روش انتشار در دیسک و ارزیابی مختلط سنجیده و غلظت موثر اسانس‌ها تعیین گردید. نتایج نشان داد که اسانس‌های هر دو گیاه در غلظت‌های ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ پی‌پی‌ام در بازداری از رشد قارچ مؤثر بودند. اسانس نعناع‌فللی توانست میزان تولید توکسین را به طور قابل توجهی کاهش دهد و در غلظت ۲۰۰۰ پی‌پی‌ام، اثر بخشی بیشتری بر بیان ژن آفلاتوکسین داشت. بنابراین، اسانس نعناع‌فللی در غلظت ۲۰۰۰ پی‌پی‌ام به عنوان یک روش بیولوژیک و ایمن در بیوکنترل آفلاتوکسین معرفی می‌شود.

واژگان کلیدی: *Aspergillus flavus*، ذرت، بیوکنترل، Realtime-PCR

Introduction

مقدمه

غلات‌هایی مانند ذرت، به دلیل ارزش غذایی و پتانسیل آن‌ها برای کاهش سوءتغذیه، در سراسر جهان محبوبیت پیدا کرده است (Temba et al., 2017). با افزایش ظرفیت تولید، مدیریت مناسب و منابع کافی در مراحل مختلف فرآوری و تولید لازم است (Nazir et al., 2019) با این حال، این فرآیند به دلیل آسیب‌پذیری غلات در برابر آلودگی آفلاتوکسین‌ها، تضعیف می‌شود که این امر ایمنی غذا را تهدید می‌کند (Oyebamiji et al., 2024). آفلاتوکسین‌ها، متابولیت‌های ثانویه سمی تولیدشده توسط گونه‌های آسپرژیلوس شامل *A. parasiticus*، *A. flavus* و *A. nomius* هستند (Aasa et al., 2023) آفلاتوکسین‌ها چهار آنالوگ اصلی دارند: AFB1، AFB2، AFG1 و AFG2 مسیرهای بیوسنتزی این آنالوگ‌ها به خوبی مستند شده‌اند (Caceres et al., 2020). *A. flavus* تنها AFB1 و AFB2 را تولید می‌کند، در حالی که *A. parasiticus* قادر به تولید هر چهار آنالوگ است (Cai et al., 2022). در میان متابولیت‌ها، AFB1 هنگامی که توسط دام

مصرف شود به AFM1 تجزیه می‌شود؛ علاوه بر این، تجزیه AFB1 به AFM1 در شیر مادر انسان گزارش شده که می‌تواند به نوزادان منتقل شود (Fakhri et al., 2019). بنابراین چندین کشور از جمله کانادا، اتحادیه اروپا، کره و ایالات متحده، مقررات سختگیرانه‌ای برای حداکثر سطوح باقیمانده آفلاتوکسین‌ها در محصولات کشاورزی و لبنیات تعیین کرده‌اند (Ali, 2019). نعناع‌فلغلی (*Mentha piperita* L.)، گیاهی دارویی چندساله از خانواده Lamiaceae است که یک هیبرید طبیعی از *M. aquatica* × *M. spicata* می‌باشد. این گیاه به دلیل ارزش تجاری و عطر متمایزش در مناطق معتدل اروپا، آسیا، آمریکا، هند و کشورهای مدیترانه‌ای کشت می‌شود. (Mahendran, 2020). برگ‌های نعناع‌فلغلی حاوی ۱,۲ تا ۳,۹ درصد اسانس و بیش از ۳۰۰ جزء شناخته شده هستند. ترپن‌ها، مونوترپن‌ها و سسکویی‌ترپن‌ها مهم‌ترین اجزای آن‌ها هستند (Sahib et al., 2013). اسانس نعناع‌فلغلی که حاوی غلظت‌های بالایی از منتول و منتون است (Brahmi et al., 2017). در مقیاس آزمایشگاهی چندین نوع باکتری، قارچ و ویروس را میکشد به طوری که محتویات آن می‌تواند به عنوان ضد باکتری، ضد قارچ و ضد ویروس توسعه یابد (Singh et al., 2015). گیاه مروتلخ (*Salvia mirzayanii*) که به نام «مور تلخ» در فارسی شناخته می‌شود، بومی ایران و از خانواده Lamiaceae است. اندام هوایی این گیاه برای اسهال، معده درد، سردرد، التیام زخم و قند خون توسط بومیان مناطق جنوبی ایران استفاده می‌شود (Ebrahimi et al., 2024). مطالعات فیتوشیمیایی قبلی بر روی مروتلخ منجر به جداسازی روغن‌های فرار از قسمت‌های هوایی این گیاهان شده است که شامل تنوعی از اجزاء می‌باشد (Valifard et al., 2014). بنابراین فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی و اثرات ایمنی‌زایی در بسیاری از تحقیقات ارزیابی شده‌اند (Rouzbahan et al., 2016). با توجه به توانایی عصاره گیاه و اسانس برای جایگزینی محصولات ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی مصنوعی، مطالعه پتانسیل مروتلخ می‌تواند برای کاربرد صنعتی این گیاه به عنوان یک محصول طبیعی مفید باشد (Ebrahimi et al., 2024). با توجه به اهمیت موضوع و اثرات مضر سم آفلاتوکسین، این مطالعه با هدف بررسی تاثیر اسانس دو گیاه دارویی مروتلخ و نعناع‌فلغلی بر توکسین زایی قارچ *A. flavus* جدا شده از ذرت و بررسی اثر آن بر بیان ژن کد کننده آفلاتوکسین با روش Real time-PCR بود.

Materials and Methods

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی، تهیه اسانس و شناسایی ترکیبهای آنها
دو گیاه دارویی مروتلخ (*Salvia mirzayanii*) و نعناع‌فلغلی (*Mentha piperita* L.) از مراتع بندرعباس جمع‌آوری، اسانس‌گیری توسط دستگاه کلونجر انجام و ترکیبات اسانس‌ها با استفاده از کروماتوگرافی گازی شناسایی شدند (Aeineh et al., 2023).

جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی قارچ و آفلاتوکسین‌ها
برای جداسازی قارچ *A. flavus* از سه سیلوی ذرت در شهرک صنعتی شیراز، نمونه‌گیری تصادفی انجام شد. نمونه‌ها پس از ضد عفونی سطحی با کلراکس ۱۰٪، بر روی محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار (PDA)

کشت داده شدند. سپس قارچ‌های رشد یافته خالص‌سازی شدند و برای اطمینان از خالص بودن، به محیط آب-آگار منتقل شدند. برای بررسی میکروسکوپی، از رنگ لاکتوفنل بلو استفاده شد و نمونه‌ها با میکروسکوپ نیکون مشاهده شدند. برای بررسی توکسین‌زایی، قارچ‌ها در محیط کشت مایع سیب‌زمینی دکستروز برات (PDB) کشت داده شدند و پس از ۲۲ روز، استخراج آفلاتوکسین با استفاده از کلروفرم انجام شد و سپس جدایه‌های توکسین‌زا برای ادامه تحقیق انتخاب شدند (Abbas et al., 2006).

ارزیابی تاثیر اسانس‌ها بر رشد *A. flavus* و تولید آفلاتوکسین
اثر اسانس گیاهان بر کاهش رشد *A. flavus* با دو روش دیسک انتشاری و اختلاط با محیط کشت طبق روش محمدی (۲۰۱۸) و پندی (۱۹۸۲) و فرمول $GI\% = (dc - dt / dc) \times 100$ محاسبه شد. حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) طبق روش لاهوجی و همکاران (۲۰۱۰) و تعیین حداقل غلظت قارچ‌کشی اسانس‌ها (MFC) با روش تامسون (۱۹۸۹) انجام شد. تاثیر اسانس‌های مروتلخ و نعنای فلفلی در محیط کشت مایع طبق روش عباس و همکاران (۲۰۰۶) بررسی و وجود آفلاتوکسین طبق روش اصغرنژاد و همکاران (۲۰۱۴) تایید شد. غلظت‌های ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ پی‌پی‌ام اسانس‌ها با استفاده از DMSO تهیه شدند. آزمایش با مؤثرترین غلظت ۲۰۰۰ پی‌پی‌ام انجام و تیمارهای آن شامل قارچ بیمارگر تنها، اسانس مروتلخ ۲۰۰۰ + قارچ، و اسانس نعنای فلفلی ۲۰۰۰ + قارچ بود.

بررسی تاثیر اسانس‌ها بر بیان ژن تولید آفلاتوکسین
بررسی‌های مولکولی با استفاده از کیت ستونی و بافرهای مختلف، RNA از سلول‌های قارچ *A. flavus* استخراج شدند سپس کیفیت RNA استخراج شده با دستگاه نانودرآپ و ژل آگارز الکتروفورز بررسی شد و در سنتز cDNA، RNA به DNA تبدیل شد، این روش با آنزیم Reverse Transcriptase انجام و از پرایمرهای Random Hexamers و Oligo dT (الیگو دی‌اکسی ریبونوکلوئوتید که یک پرایمر برای شروع سنتز cDNA است) استفاده شد به جهت باز شدن ساختار ثانویه RNA، در نهایت cDNA ساخته شده در فریزر منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Selma et al., 2008).

بررسی بیان ژن‌های afIR و B-actin: پرایمرها با نرم افزار Allele IDv7.8 طراحی و ژن B-actin به عنوان کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت و تمام پرایمرها به صورت اتصال اگزون-اگزون طراحی شدند، سپس کارایی PCR و منحنی استاندارد برای هر پرایمر اندازه‌گیری شده است (جدول ۱). آنالیز کیفی DNA روی ژل آگارز انجام شد و برای این کار از بافر TAE استفاده شد. با الکتروفورز ژل آگارز، نمونه‌های DNA روی ژل آگارز لود شد و با جریان الکتریکی و اشعه UV، باندهای DNA را تفکیک و مشاهده کردیم. برای تعیین کارایی PCR و منحنی استاندارد و انجام Real-time PCR از رنگ‌های فلورسنت یا پروب‌های مخصوص برای اندازه‌گیری سطح سیگنال فلورسنت در هر چرخه واکنش استفاده شد. برای تعیین کارایی PCR و منحنی استاندارد، از چند نمونه با غلظت‌های مختلف از DNA هدف استفاده شد. با رسم منحنی تکثیر و منحنی استاندارد، مقادیر Ct و E به دست آمد Ct نشان دهنده چرخه آستانه و E نشان دهنده کارایی PCR

جدول ۱. توالی پرایمرهای رفت و برگشت ژن‌های مورد نظر جهت واکنش Real-time PCR

Table 1. Reverse and forward primers sequence of desired genes for Real-time PCR reaction

Genes	Primer Sequences	Sizes (bp)
AflR	Forward: 5'-ATGGTAGCAGTAGCGTCTCC-3'	164
	Reverse: 5'-TTCCGTGTTCCATTGACTGC-3'	
B-Actin	Forward: 5'-CAAGAGATGGCCACGGCTGCT-3'	284
	Reverse: 5'-TCCTTCTGCATCCTGTCGGCA-3'	

است. پس از اتمام فعالیت دستگاه و مشاهده نمودارها مبنی بر افزایش تعداد قطعه مورد نظر و میزان نشرفلورسانس با محاسبه $\Delta\Delta Ct$ میزان تغییر در بیان ژن مورد نظر نسبت به B-actin که گروه کنترل است را سنجیدیم و سپس با استفاده از فرمول $\Delta\Delta Ct-2$ میزان بیان آن محاسبه گردید.

طرح آزمایشی و واکاوی داده‌ها

آزمایش تاثیر اسانس بر کنترل رشد قارچ در دو شیوه دیسک انتشاری و اختلاط اسانس با محیط کشت در قالب طرح کاملاً تصادفی با آزمایش فاکتوریل انجام شد. فاکتور اول نوع گیاه (دارای دو سطح، دو گیاه) و فاکتور دوم غلظت اسانس (دارای چهار سطح، غلظت صفر یا شاهد و غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ پی‌پی‌ام). بنابراین در هر روش آزمایشی طرح دارای چهار تیمار در سه تکرار بود. در آزمایش تاثیر اسانس بر کاهش تولید توکسین در محیط کشت مایع آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تیمار در سه تکرار انجام شد. نتایج با استفاده از نرم افزار SAS ver 9.0 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه شدند و نمودارها با برنامه اکسل رسم شدند. برای آنالیز داده‌های حاصل از بیان ژن از مدل دلتا $\Delta\Delta Ct$ تصحیح شده با بازدهی تکثیر و آزمون T1test استفاده شد.

Results

یافته‌ها

ترکیب‌های اسانس‌های گیاهی

تعیین ترکیب‌های تشکیل دهنده اسانس‌ها بیشترین و مهمترین ترکیبات موجود در اسانس گیاه نعنای فلفلی کاروون (ترکیب شاخص) ۶۶/۶۵۹، و کمترین ترکیب ترنس‌دی‌هیدروکاروون ۰/۲۶ بود و همچنین در گیاه مروتلخ لینالیل استات (ترکیب شاخص) ۱۵/۹۶۱ و کمترین ترکیب متعلق به بتا-پینن ۱/۲۵ بود (جدول ۲)

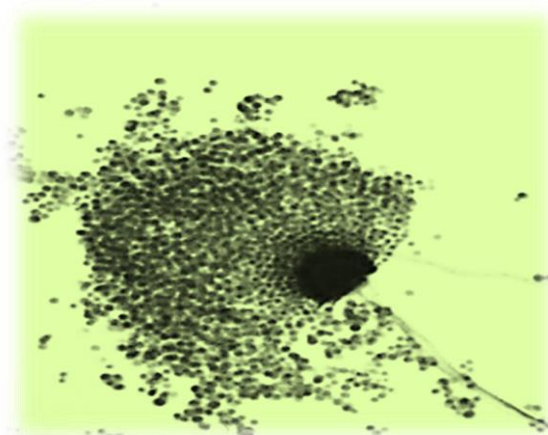
خصوصیات *A. flavus* و آفلاتوکسین‌های آن

قارچ *A. flavus* جدا شده دارای پرگنه سبز رنگ با حاشیه سفید و کنیدیوم‌های سبز زیتونی بود شده‌اند. کنیدیوم‌ها کروی و بیضی شکل و بافت صاف و کمی زبر دارند. کنیدیوفورها دیواره ضخیم داشتند و وزیکول‌های کروی بودند. متولا و فیالید لایه‌های روی وزیکول بودند، که کنیدیوم‌های کروی روی آن‌ها به شکل زنجیری از فیالیدها زاده شده بودند (شکل ۱).

جدول ۲. درصد ترکیبهای اصلی اسانس نعناع‌فلفی و مروت‌لخ

Table 2. Percentage of major constituents in *Salvia mirzayanii* and *Mentha piperita*

<i>Mentha piperita</i>		<i>Salvia mirzayanii</i>	
Compound	%	Compound	%
Carvone	66.659	Linalyl acetate	15.961
Limonene	20.715	5-neo-Cedranol	9.485
Myrcene	1.216	Linalool	8.898
cis-Dihydro carvone	1.188	1,8-Cineole	7.424
1,8-Cineole	0.982	a-Terpinyl acetate	6.716
p-Cymene	0.744	Spathulenol	6.492
b-Bourbonene	0.736	d-Cadinene	4.294
b-Pinene	0.691	a-Terpineol	4.02
(E)-Caryophyllene	0.527	Bicyclogermacrene	2.737
a-Pinene	0.478	Aromadendrene	1.958
Terpinen-4-ol	0.416	Germacrene D-4-ol	1.836
Sabinene	0.389	b-Eudesmol	1.821
Menthol	0.379	a-Cadinol	1.773
a-Terpinene	0.304	Geranyl acetate	1.741
3-Octanol	0.29	epi-a-Cadinol	1.595
Germacrene D	0.261	Myrcene	1.552
trans-Dihydro carvone	0.26	b-Pinene	1.25



شکل ۱. کنیدیوفور، حباب انتهایی کنیدیوفور، فیالید و زنجیرهای کنیدیوم‌های *A. flavus*.

Figure 1. Conidiophore, terminal vesicle of the conidiophore, phialide, and chains of conidia in *A. flavus*.

همچنین با تزریق نمونه‌ی استخراج شده از قارچ به دستگاه HPLC نیز وجود آفلاتوکسین در نمونه تایید گردید و میزان آفلاتوکسین کل ۱/۷۹ بود (جدول ۳).

جدول ۳. میزان توکسین در نمونه استخراج شده.

Table 3. The amount of toxin in the extracted sample.

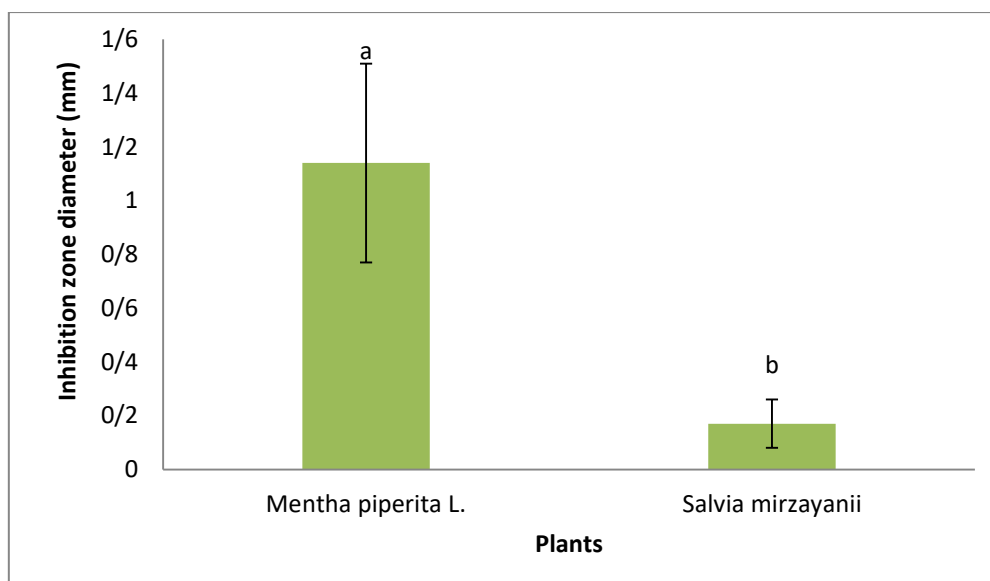
No.	Toxin name	Concentration(ppb)
1	Aflatoxins B1	1.49
2	Aflatoxins B2	0.3
3	Aflatoxins G1	N.D
4	Aflatoxins G2	N.D
5	Total Aflatoxins	1.79

تاثیر اسانس‌ها بر رشد *A. flavus* و تولید آفلاتوکسین

نتایج حاصل از آزمایش دیسک انتشار نشان داد که اسانس نعناع‌فلغلی بازدارندگی بیشتری نسبت به اسانس مروتلخ بر رشد قارچ *A. flavus* داشت. قطر هاله عدم رشد در نعناع‌فلغلی 0.37 ± 1.14 میلی‌متر و در مروتلخ 0.09 ± 0.17 میلی‌متر بود، که تفاوت آن‌ها از نظر آماری معنی‌دار بود (شکل ۲). غلظت ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر بیشترین بازدارندگی را نشان داد و با کاهش غلظت، بازدارندگی نیز کاهش یافت. در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر و صفر بازدارندگی مشاهده نشد و قطر هاله عدم رشد برابر صفر بود.

بر اساس نتایج به دست آمده از این پژوهش مشخص گردید، افزودن اسانس مروتلخ به محیط کشت باعث گردید قطر رشد قارچ *A. flavus* به طور معنی‌داری کاهش یابد و به 2.28 سانتی‌متر کاهش یافت. در حالیکه استفاده از اسانس نعناع‌فلغلی در محیط کشت باعث شد قطر رشد قارچ مذکور به 3.03 سانتی‌متر برسد که اختلاف معنی‌داری با تیمار فوق داشت.

نتایج تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت قارچ‌کشی اسانس‌ها (MFC) در جدول ۴



شکل ۲. مقایسه دو گیاه مختلف از نظر قطر هاله عدم رشد قارچ *A. flavus*

Figure 2. Comparison of two different plants in terms of the diameter of the halo of *A. flavus* fungi growth

جدول ۴. حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت قارچ‌کشی اسانس‌های گیاهی بر *A. flavus*

Table 4. Minimum inhibitory concentration and minimum fungicidal concentration of plant essential oils on *A. flavus*

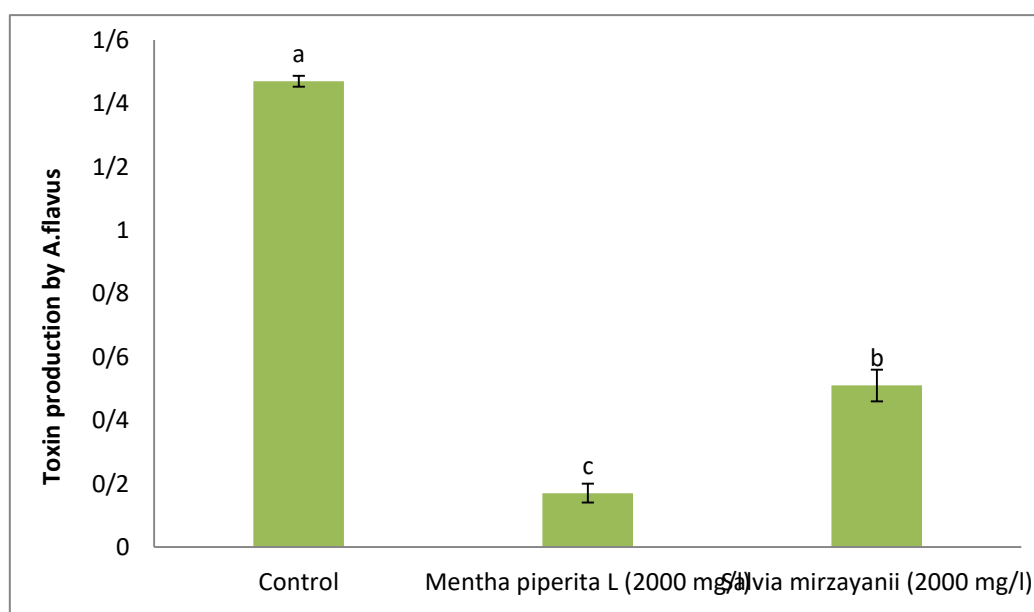
Concentration (mg/l)	<i>Salvia mirzayanii</i>		<i>Mentha piperita</i>	
	MFC	MIC	MFC	MIC
1000	10^{-10}	10^{-10}	10^{-2}	$10^{-2}, 10^{-1}$
2000	10^{-10}	10^{-10}	10^{-3}	$10^{-3}, 10^{-2}, 10^{-1}$

نشان داده شده است.

بر اساس نتایج به دست آمده مشخص گردید، عدم کاربرد اسانس‌ها (تیمار شاهد) باعث افزایش قابل توجه و معنی‌دار تولید توکسین توسط قارچ *A. flavus* جدا شده از ذرت شد و بیشترین (۱/۴۷) مقدار را دارا بود. با کاربرد غلظت ۲۰۰۰ میلی گرم در لیتر اسانس گیاهان مختلف از میزان تولید توکسین توسط قارچ *A. flavus* به طور قابل توجهی کاسته شد. کاربرد اسانس نعناع‌فلغلی با غلظت ۲۰۰۰ میلی گرم در لیتر باعث گردید میزان تولید توکسین به ۰/۱۷ برسد که به طور معنی‌داری کمتر از سایر تیمارها بود (شکل ۳).

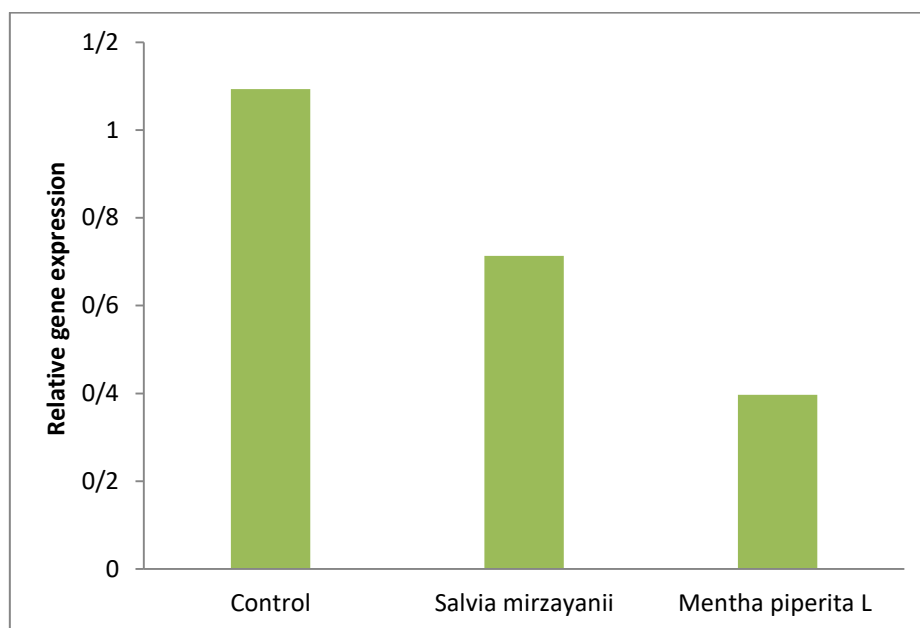
تأثیر اسانس‌ها بر بیان ژن تولید آفلاتوکسین

بر اساس نتایج به دست آمده از مقایسه میانگین تیمارها توسط آزمون دانکن مشخص گردید، عدم کاربرد اسانس‌ها (تیمار شاهد) باعث افزایش قابل توجه و معنی‌دار ژن‌های تولید کننده آفلاتوکسین توسط *A. flavus* جدا شده از ذرت شد و بیشترین (۱/۰۹) مقدار را دارا بود. با کاربرد غلظت ۲۰۰۰ میلی گرم در لیتر اسانس گیاهان مختلف از میزان ژن‌های تولید کننده آفلاتوکسین توسط قارچ *A. flavus* به طور قابل



شکل ۳. تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس‌ها بر میزان تولید توکسین توسط قارچ *A. flavus*

Figure 3. The effect of different concentrations of essential oils on the amount of toxin production by *A. flavus*.



شکل ۴. تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس‌ها بر ژن‌های تولید کننده آفلاتوکسین توسط قارچ *A. flavus*
Figure 4. The effect of different concentrations of essential oils on the genes producing aflatoxin by *A. flavus* fungus.

توجهی کاسته شد. کاربرد اسانس نعناع‌فللی با غلظت ۲۰۰۰ میلی گرم در لیتر باعث گردید ژن‌های تولید کننده آفلاتوکسین به ۰/۴۰ برسد که کمتر از سایر تیمارها بود، در نهایت تیمار شاهد با تیمار مروتلخ از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری نداشت، مروتلخ هم با تیمار نعناع‌فللی تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل ۴).

Discussion

بحث

آفلاتوکسین‌ها متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که عمدتاً توسط قارچ‌های *A. parasiticus* و *A. flavus* بر روی محصولات کشاورزی مانند غلات، حبوبات، میوه‌جات و خشکبار تولید می‌شوند (Weaver et al., 2022). قوی‌ترین زهرابه‌های قارچی، آفلاتوکسین نوع B1 و M1 هستند که منجر به سرطان و سرکوب سیستم ایمنی در انسان و حیوانات می‌شوند (Liu & Wu, 2010). بنابراین کاهش میزان تولید این سموم خطرناک به روش‌های ساده و ارزان (زیستی، شیمیایی و فیزیکی) لازم و ضروری می‌باشد. در پژوهش حاضر قارچ *A. flavus* از دانه‌های ذرت جداسازی و خالص‌سازی شد و مشخصات میکروسکوپی آن بر روی محیط کشت PDA مشاهده شد. در پژوهشی ۴۳ جدایه از ذرت و خاک توسط مشخصات مورفولوژیکی بررسی شدند. مشخصات میکروسکوپی و میکروسکوپی *A. flavus* شامل کنیدیفور، وزیکول، متولا، فیالید و کنیدیوم با نتایج این تحقیق مطابقت داشتند (Thathana et al., 2017). در پژوهش حاضر، اسانس نعناع‌فللی در مقایسه با مروتلخ بازدارندگی بیشتری بر رشد قارچ *A. flavus* و کاهش تولید توکسین داشت. هر دو اسانس در غلظت‌های ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ پی‌پی‌ام اثر بازدارندگی و کاهش تولید توکسین داشتند، اما نعناع‌فللی مؤثرتر بود. این نتیجه با پژوهش دیگری که نشان داد اسانس نعناع‌فللی رشد میسیلیومی قارچ و تولید آفلاتوکسین

را کاهش می‌دهد، مطابقت داشت (Gorran et al., 2015). نتایج این پژوهش با نتایج دیگر پژوهش‌ها همخوانی دارد. عصاره رزماری توانست رشد قارچ‌ها را مختل کرده و تأثیر مهارکنندگی بر بیان ژن *AFL1* و تولید آفلاتوکسین در قارچ *A. flavus* داشته باشد (Mohammadi et al., 2018) و همچنین، عصاره مریم‌گلی و زیره سبز در غلظت‌های بالا از تولید آفلاتوکسین در مغز پسته جلوگیری کردند (Tavaklipour et al., 2018). در پژوهشی که به بررسی فعالیت ضد قارچی و ضد آفلاتوکسیژنیک اسانس گیاه ماسویا در برابر قارچ *A. flavus* مولد سم آفلاتوکسین (AFB) انجام گرفت نتایج نشان داد که ماده مؤثره اسانس گیاه ماسویا (C10 massoia lactone) می‌تواند گزینه مناسبی به عنوان نگهدارنده طبیعی برای کنترل آلودگی قارچی و آلودگی میکوتوکسین در غذاها و خوراکی‌ها باشد (Lee et al., 2023). در پژوهشی کاربرد اسانس و عصاره‌های مرزه خوزستانی و مرزه ماکروسیفون در جلوگیری از رشد میسلیمومی، تولید آفلاتوکسین توسط قارچ *A. flavus* و تجزیه آفلاتوکسین B1 در محیط کشت مایع بررسی شد. نتایج نشان داد که اسانس و عصاره‌های اتانولی و اتانولی ۷۰٪ مرزه خوزستانی بیشترین تأثیر در جلوگیری از رشد قارچ را داشتند. اسانس‌های مرزه خوزستانی و مرزه ماکروسیفون در غلظت 250 mg/L به ترتیب باعث ۹۸ و ۳۳/۵۲٪ بازدارندگی از تولید آفلاتوکسین B1 شدند (Gorran et al., 2015). همچنین در پژوهش دیگری اثربخشی یازده اسانس گیاهان دارویی در برابر *A. flavus* NRRL 3357 نشان داد که بالاترین فعالیت ضد قارچی در برابر این قارچ آفلاتوکسیژن در دارچین، پونه‌کوهی و علف لیمو بود که حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) پایینی را در شرایط بخار نشان دادند (Xiang et al., 2020).

نتایج تحقیق حاضر در مورد ژن تولید آفلاتوکسین و نحوه بیان آن با برخی پژوهش‌های صورت گرفته مطابقت دارد (Mohammadi et al., 2018). در پژوهشی تأثیر دما و نیاز آبی بر روی رشد محصول آفلاتوکسین BI و نیز بیان دو ژن تنظیمی *afIR* و *afRs* و دو ژن ساختاری *afID* و *afLO* (بیوسنتز آفلاتوکسین) مربوط به *A. flavus* را در محیط بادم آگار بررسی و گزارش نمودند که بیشترین تجمع زیستی قارچی و تولیدات آفلاتوکسینی در دمای ۲۸ درجه سلیسیوس بدست آمد. در شرایط بدون رطوبت هیچ آفلاتوکسینی تولید نشد. همچنین آزمون RT-PCR نشان داد که دو ژن تنظیمی در کمینه محصولات آفلاتوکسینی و بیشینه دمایی بیان بالایی دارند. در مقابل دو ژن ساختاری در کمینه تولیدات آفلاتوکسینی بیان بالایی دارند. همچنین دما را به عنوان عامل مهم در تولید محصول آفلاتوکسینی وابسته به القای ژن‌های ساختاری بیوسنتز است (Gallo et al., 2016).

در پژوهش که با هدف بررسی اثرات بازدارنده سه مونوترپن اسانس زنجبیل بر رشد و تولید آفلاتوکسین *A. flavus* و تنظیم ژن آن‌ها در بیوسنتز آفلاتوکسین با روش RT-qPCR انجام گرفت نتایج نشان داد که همه ترکیبات اسانس فعالیت ضدقارچی قوی در ۱۰۰۰ Lg/mL نشان دادند و فعالیت ضدقارچی *c-terpinene* و سیترال تا زمان تیمار با محلول رقیق ده برابر باقی ماند. در میان سه ترکیب اصلی (*c-terpinene*, *isoborneol*, and *citral*) *c-terpinene* و سیترال به طور قابل توجهی بیان بسیاری از ژن‌های آزمایش شده را کاهش دادند، اما الگوی متفاوتی از کاهش بیان مشاهده شد. -ترپنین *afIR*، *afIS* و *yap* را کاهش داد، در حالی که سیترال بیان *afIC* و *afIG* را تغییر نداد. بنابراین، سی‌ترپنین و سیترال ممکن است

پتانسیل کنترل رشد *A. flavus* و تولید آفلاتوکسین در محصولات کشاورزی، از جمله در مرحله ذخیره سازی را داشته باشند (Moon et al., 2018).

Conclusion

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که در دو آزمایش بازداري از رشد به روش انتشار در دیسک و اختلاط با محیط کشت، در میان اسانس گیاهان مورد استفاده نسبت به شاهد، میزان بازدارندگی از رشد در غلظت‌های ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ پی‌پی‌ام افزایش یافت اما اثر بخشی اسانس گیاه نعنای فلفلی بیشتر بود. در آزمایش کاهش تولید توکسین در محیط کشت مایع که با موثرترین غلظت اسانس هر دو گیاه انجام شد، کاربرد غلظت ۲۰۰۰ پی‌پی‌ام اسانس گیاهان مروتلخ و نعنای فلفلی از میزان تولید توکسین توسط قارچ *A. flavus* به طور قابل توجهی کاسته شد اما اسانس گیاه نعنای فلفلی باعث شد میزان تولید توکسین به ۰/۱۷ برسد که به طور معنی‌داری کمتر از سایر تیمارها بود و اختلاف بین این دو گیاه از نظر آماری معنی‌دار بود. در بررسی‌های مولکولی مشخص شد که اسانس هر دو گیاه در غلظت ۲۰۰۰ پی‌پی‌ام توانایی تأثیرگذاری بر بیان ژن کد کننده آفلاتوکسین را داشتند اما اثر بخشی اسانس گیاه نعنای فلفلی به نظر میرسد به دلیل ترکیب شاخص کاروون بیشتر بود. با توجه به نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر می‌توان نتیجه گرفت که اسانس هر دو گیاه دارویی با موثرترین غلظت اسانس که ۲۰۰۰ پی‌پی‌ام بود توانایی تأثیرگذاری بر بیان ژن کد کننده آفلاتوکسین را داشتند اما اسانس گیاه نعنای فلفلی را میتوان به عنوان جدایه‌ای کاربردی در بیوکنترل آفلاتوکسین معرفی نمود.

سپاسگزاری

از حوزه معاونت محترم پژوهشی و همچنین مسئولین آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز که امکانات لازم برای اجرای این پژوهش را فراهم نمودند تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

References

منابع

1. Aasa, A., Fru, F., Adelusi, O., Oyeyinka, S., & Njobeh, P. (2023). A review of toxigenic fungi and mycotoxins in feeds and food commodities in West Africa. *World Mycotoxin Journal*, 16(1), 33-47.
2. Abbas, H. K., Cartwright, R. D., Xie, W., & Shier, W. T. (2006) Aflatoxin and fumonisin contamination of corn (maize, *Zea mays*) hybrids in Arkansas. *Crop protection*, 25(1), 1-9.
3. Aeineh, M., Najafian, S., & Hosseinfarahi, M. (2023). Investigating the Phenological Stages of Essential Oil Yield and Essential Oil Compounds and Phytochemical Properties of *Artemisia absinthium* L. (Wormwood). *Russian Journal of Plant Physiology*, 70(6), 149.

4. Ali, N. (2019). Aflatoxins in rice: Worldwide occurrence and public health perspectives. *Toxicology Reports*, 6, 1188-1197.
5. Asgharnezhad, F., Mahdian, S., Amiri Besheli, B., & Jafar Nazari, S. (2014). Investigation of the production of B1, B2, G1 & G2 aflatoxins in some species of *Aspergillus* with high performance liquid chromatography (HPLC) methods. *Research in Plant Pathology*, 2(2), 55-70.
https://rpp.marvdasht.iau.ir/article_561_16d33393254dd38b5adfa53b2d2fee7c.pdf
6. Brahmi, F., Khodir, M., Mohamed, C., & Pierre, D. (2017). Chemical composition and biological activities of *Mentha* species. *Aromatic and medicinal plants-Back to nature*, 10, 47-79.
7. Caceres, I., Khoury, A. A., Khoury, R. E., Lorber, S., Oswald, I. P., Khoury, A. E., . . . Bailly, J. D. (2020). Aflatoxin Biosynthesis and Genetic Regulation: A Review. *Toxins (Basel)*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/toxins12030150>
8. Cai, J., Yan, R., Shi, J., Chen, J., Long, M., Wu, W., & Kuca, K. (2022). Antifungal and mycotoxin detoxification ability of essential oils: A review. *Phytotherapy Research*, 36(1), 62-72.
9. Ebrahimi, M., Gharehbagh, H. J., Dabaghian, F., Mojtavavi, S., Khademian, S., Saeedi, M., Khanavi, M. (2024). *Salvia mirzayanii* and *Salvia hypoleuca* Essential Oils: Chemical Composition, Alpha-Glucosidase Inhibitory, and Synergistic Effects of Selected Components. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*(In Press).
10. Fakhri, Y., Ghorbani, R., Taghavi, M., Keramati, H., Amanidaz, N., Moradi, B., Khaneghah, A. M. (2019). Concentration and prevalence of aflatoxin M1 in human breast milk in Iran: Systematic review, meta-analysis, and carcinogenic risk assessment: A review. *Journal of Food Protection*, 82(5), 785-795.
11. Gallo, A., Solfrizzo, M., Epifani, F., Panzarini, G., & Perrone, G. (2016). Effect of temperature and water activity on gene expression and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus* on almond medium. *International Journal of Food Microbiology*, 217, 162-169.
12. Gorran, A., Salehnia, B., Farzaneh, H. R., Farzaneh, M., & Shivazad, M. (2015). Effect of essential oils and extracts of *Satureja macrosiphon* and *Satureja khozistanica* on mycelial growth and aflatoxin B1 production in *Aspergillus flavus*. *Journal of Veterinary Research*, 70(2), 139-145.
13. Lahooji, A., Mirabolfathy, M., & Karami-Osboo, R. (2010). Effect Of *Zataria Multiflora* and *Satureja Hortensis* Essential Oils, Thymol and Carvacrol on growth of *Fusarium Gramineum* Isolates and Deoxynivalenol production. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 46(1), 37-50.
14. Lee, Y., Park, S. J., Kim, K., Kim, T.-O., & Lee, S.-E. (2023). Antifungal and antiaflatoxigenic activities of massoia essential oil and C10 massoia lactone against aflatoxin-producing *Aspergillus flavus*. *Toxins (Basel)*, 15(9), 571.
15. Liu, Y., & Wu, F. (2010). Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: a risk assessment. *Environ Health Perspect*, 118(6), 818-824.
<https://doi.org/10.1289/ehp.0901388>

16. Mahendran, G., & Rahman, L. U. (2020). Ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological updates on Peppermint (*Mentha × piperita* L.)-A review. *Phytother. Res.*, 34(9), 2088-2139.
17. Mohammadi, M., Hashemi, S. J., Rezaie, S., & Bayat, M. (2018). Assessment of antifungal activity of Rosemary oil extract and its effect on AFL1 gene expression in *Aspergillus flavus* by Real-Time PCR. *Journal of Microbial World*, 11(1), 88-100.
18. Moon, Y.-S., Lee, H.-S., & Lee, S.-E. (2018). Inhibitory effects of three monoterpenes from ginger essential oil on growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* and their gene regulation in aflatoxin biosynthesis. *Applied Biological Chemistry*, 61, 243-250.
19. Nazir, A., Kalim, I., Sajjad, M., Usman, M., & Iqbal, M. (2019). Prevalence of aflatoxin contamination in pulses and spices in different regions of Punjab. *Chem. Int.*, 5(4), 274.
20. Oyebamiji, Y. O., Shamsudin, N. A., Adebayo, I. A., Umar, O. B., Mohd Zaini, N. A., & Ismail, M. N. (2024). Aflatoxins in Cereals: Prevalence, Health Implications and Management Strategies: A Review. *Egyptian Journal of Botany*.
21. Pandey, D. K., Trpathi, N. N., Tripathi, R. D., & Dixit, S. N. (1982). Fungitoxic and phytotoxic properties of the essential oil of *H. suaveolens*. *Zeit. Pflanzkrankheiten und Pflanzenschutz*, 89, 344-349.
22. Raja, R. R. (2012). Medicinally potential plants of Labiatae (Lamiaceae) family: an overview.
23. Rouzbahan, S., Moein, S., & Homaei, A. (2016). Total antioxidant capacities and reduction of ferric ions by extracts of three medicinal plants and their fractions. *Hormozgan Medical Journal*, 20(4), 201-209.
24. Sahib, N. G., Anwar, F., Gilani, A. H., Hamid, A. A., Saari, N., & Alkharfy, K. M. (2013). Coriander (*Coriandrum sativum* L.): A potential source of high-value components for functional foods and nutraceuticals-A review. *Phytotherapy Research*, 27(10), 1439-1456.
25. Selma, M. V., Martínez-Culebras, P. V., & Aznar, R. (2008). Real-time PCR based procedures for detection and quantification of *Aspergillus carbonarius* in wine grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 122(1-2), 126-134 .
26. Singh, R., Shushni, M. A., & Belkheir, A. (2015). Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. *Arabian Journal of Chemistry*, 8(3), 322-328.
27. Tavaklipour, H., Zabar Jani, L., & Javanmard Dari, M. (2018). Comparison of the effect of sage extract and cumin in preventing toxin production of *Aspergillus flavus* fungus in pistachio nuts. *Journal of Innovation in Food Science and Technology*, 10, 11-24.
28. Temba, M. C., Njobeh, P., & Kayitesi, E. (2017). Storage stability of maize-groundnut composite flours and an assessment of aflatoxin B1 and ochratoxin A contamination in flours and porridges. *Food Control*, 71, 178-186.
29. Thathana, M. G., Murage, H., Abia, A. L. K., & Pillay, M. (2017). Morphological characterization and determination of aflatoxin-production potentials of *Aspergillus flavus* isolated from maize and soil in Kenya. *Agriculture*, 7(10), 80.

30. Thompson, D. (1989). Fungitoxic activity of essential oil components on food storage fungi. *Mycologia*, 81(1), 151-153.
31. Valifard, M., Mohsenzadeh, S., Kholdebarin, B., & Rowshan, V. (2014). Effects of salt stress on volatile compounds, total phenolic content and antioxidant activities of *Salvia mirzayanii*. *South African Journal of Botany*, 93, 92-97.
32. Weaver, M. A., Callicott, K. A., Mehl, H. L., Opoku, J., Park, L. C., Fields, K. S., & Mandel, J. R. (2022). Characterization of the *Aspergillus flavus* Population from Highly Aflatoxin-Contaminated Corn in the United States. *Toxins (Basel)*, 14(11).
33. Xiang, F., Zhao, Q., Zhao, K., Pei, H., & Tao, F. (2020). The efficacy of composite essential oils against aflatoxigenic fungus *Aspergillus flavus* in maize. *Toxins (Basel)*, 12(9), 562.