

## بررسی مکانیسم مولکولی کاهش بیوسنتز آفلاتوکسین B1 تحت تأثیر عصاره‌های گیاهان دارویی انجدان طیب (*Heracleum persicum*) و حرمل (*Peganum harmala*) برگرفته از دانش طب سنتی ایرانیان

نسیم صفری الف\*، رقیه همتی الف، مهران میراب‌زاده اردکانی ب، امید عینی الف

الف گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

ب گروه داروسازی سنتی، دانشکده طب ایرانی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

### چکیده

سابقه و هدف: Aflatoxin B1 (AFB1) تولیدشده توسط چندین گونه از آسپرژیلوس، مشکل و تهدید جدی در زمینه کشاورزی و پزشکی می‌باشد و به علت خصوصیات کارسینوژنیک، موتاژنیک، تراژنیک، سمیت کبدی و نقص سیستم ایمنی جزو کلاس اول مواد سرطان‌زای انسانی طبقه‌بندی شده است و بسیاری از محصولات کشاورزی را در سراسر جهان آلوده می‌کند. استفاده از ترکیبات طبیعی که قادر به جلوگیری از تولید آفلاتوکسین هستند، می‌تواند یک استراتژی جایگزین برای محدود کردن آلودگی‌های مواد غذایی و خوراک دام در راستای کشاورزی پایدار باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه با استناد به گیاهان دارویی استفاده‌شده در کنترل آفات که در منابع مکتوب طب و کشاورزی سنتی ایران ذکر شده بود، اثر مهار رشد قارچی و ممانعت از تولید آفلاتوکسین B1 توسط عصاره‌های گیاهان دارویی گلپر (*Heracleum persicum*) و اسپند (*Peganum harmala*) بررسی شد. همچنین بررسی مکانیسم‌های مهار رشد قارچ و مهار بیوسنتز AFB1 در سطح مولکولی و رونویسی، توسط آنالیز LC-MS و آنالیز ژنی برخی از ژن‌های کلیدی (*aflR* و *aflP*، *aflM*) موجود در خوشه ژنی تولید AFB1 مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها: نشان داده شد که عصاره‌های گیاه دارویی گلپر در غلظت ۴ و اسپند در غلظت ۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اثر مهارکنندگی ۱۰۰ درصد تولید آفلاتوکسین B1 را با وجود عدم ممانعت از رشد کامل قارچ دارد. نتایج این مطالعه نشان داد که اضافه شدن ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره گلپر در محیط کشت قارچ *Aspergillus flavus* تقریباً به مهار کامل بیان ژن‌های *aflP*، *aflM* منجر می‌شود. در حضور عصاره‌های مورد مطالعه، سطح بیان ژن‌های *aflP*، *aflM* و *aflR* موجود در خوشه ژنی بیوسنتز AFB1 کاهش یافت و در برخی غلظت‌ها متوقف شد.

نتیجه‌گیری: براساس مطالعه حاضر نشان داده شد که مهار بیوسنتز آفلاتوکسین به دلیل کاهش سطح بیان ژن‌های موجود در خوشه ژنی بیوسنتز آفلاتوکسین در اثر غلظت‌های ذکر شده عصاره‌های گلپر و اسپند اتفاق می‌افتد. در میان ژن‌های مورد مطالعه ژن *aflP* بیشترین هماهنگی را با کاهش تولید آفلاتوکسین نشان داد. نتایج این مطالعه می‌تواند شواهدی بر کارابودن استفاده از این ترکیبات در مواد غذایی، خوراک دام و گیاهان دارویی مستعد به این آلودگی باشد.

تاریخ دریافت: مهر ۱۳۹۸

تاریخ پذیرش: خرداد ۱۴۰۰

کلیدواژه‌ها: آفلاتوکسین B1، آسپرژیلوس، بیان ژن، انجدان طیب، حرمل

### مقدمه:

*Aspergillus parasiticus* در طیف وسیعی از محصولات غذایی تولید می‌گردند. آفلاتوکسین B1 (AFB1) به عنوان سمی‌ترین و سرطان‌زاترین سموم قارچی طبقه‌بندی می‌شود (۱، ۲، ۳).

ارزیابی‌های آزمایشگاهی نشان داده است که قرارگرفتن حیوانات آزمایشگاهی به صورت کوتاه‌مدت در معرض دوزهای بالای AFB1 به سمیت حاد منجر می‌شود که با تب، دردهای

در میان سموم قارچی (مایکوتوکسین)، آفلاتوکسین‌ها تهدید جدی برای سلامتی انسان، دام و همچنین تجارت بین‌المللی محسوب می‌شوند. آفلاتوکسین‌ها در واقع متابولیت‌های ثانویه قارچی و دارای خصوصیات سمی، سرطان‌زا، موتاژنیک و عوامل محرک سیستم ایمنی می‌باشند و اغلب توسط دو گونه قارچی *Aspergillus flavus* و

به دلیل منشأ طبیعی و عوارض جانبی پایین آن‌ها رو به افزایش است (۱۰). پژوهش‌های بسیاری وجود دارد که اثرات ضدقارچی اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی در برابر قارچ *A. flavus* را بر روی محیط کشت نشان می‌دهد (۱۲، ۱۳، ۱۴).

تولید آفلاتوکسین توسط قارچ اسپرژیلوس تحت تأثیر عوامل مختلف محیطی نظیر دما، رطوبت و نور قرار دارد. مسیر بیوستنز آفلاتوکسین B1 یکی از مسیرهای ژنی شناسایی شده متابولیت‌های ثانویه قارچی است (۱۵). در قارچ *A. flavus* ژن‌هایی که به‌طور مستقیم در بیوستنز آفلاتوکسین دخیل هستند در خوشه ژنومی حدود ۸۰ کیلوبایتی قرار دارند که حاوی ۲۷ ژن و حدود ۲۱ واکنش آنزیمی هستند (۱۰، ۱۶، ۱۷). علاوه بر ژن‌های موجود در خوشه ژنی آفلاتوکسین، پژوهش‌ها نشان داده است که ژن‌های تنظیم‌کننده خارجی مثل *VeA* و *LaeA* در تولید آفلاتوکسین نقش دارند (۱۸، ۱۹، ۲۰).

*Liang* و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان دادند که سینامالدهید، سیترال و اوگونول به ترتیب در غلظت‌های ۰/۴، ۰/۵۶ و ۰/۸ میلی‌مول بر لیتر، تولید *AFB1* و بیان ژن‌های *A. flavus* را در *aflP*، *aflM*، *aflR*، *aflT*، *aflD* کاهش می‌دهد (۲۱).

*Caceres* و همکاران در سال ۲۰۱۶ اثر مهاري اوگونول را در تولید *AFB1* با استفاده از روش *Quantitative PCR* در مقیاس بزرگ (*Large-Scale q-PCR*)، بررسی کردند و نشان دادند که اوگونول در غلظت ۰/۵ میلی‌مول بر لیتر محیط کشت عصاره مالت-آگار قادر به کنترل بیان ۲۶ ژن از ۲۷ ژن خوشه بیوستنز آفلاتوکسین است (۱۶). در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۱۷ توسط *El Khoury* و همکاران انجام گرفت نشان داده شد که عصاره آبی گیاه *Micromeria graeca* در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مانع از تولید *AFB1* تولیدشده توسط *A. flavus* بدون کاهش رشد قارچ می‌شود. همچنین تجزیه و تحلیل‌های مولکولی ۶۱ ژن، از جمله ۲۷ ژن مربوط به خوشه ژنی بیوستنز آفلاتوکسین و ۳۴ ژن تنظیم‌کننده متابولیسم ثانویه، سرکوب تمامی ژن‌های خوشه ژنی آفلاتوکسین و همچنین ۱۵ ژن تنظیم‌کننده عمومی را نشان داد (۲۲).

شکمی، بی‌حالی، استفراغ، ادم و از دست‌دادن کشنده عملکرد کبد همراه است (۴). آفلاتوکسین‌ها در صورت مصرف در دوزهای مزمن، می‌توانند در طی ۷۲ ساعت به مرگ منجر شوند (۵، ۶). علاوه بر عواقب جدی که قارچ‌های توکسین‌زا بر روی سلامتی دارند، سالانه زیان‌های اقتصادی فراوانی را به محصولات غذایی تحمیل می‌کنند. از این رو آشکار است که تحقیقات بیشتر و ارزیابی تکنیک‌های نوین و کم‌خطر در راستای کاهش آلودگی‌های قارچی اهمیت ویژه‌ای دارد (۴، ۵، ۷).

نظارت بر کیفیت مواد غذایی و اجرای روش‌های صحیح کنترل در کلیه مراحل تولید، امری ضروری و مهم برای تمامی کشورها محسوب می‌شود و در نهایت باعث اطمینان مصرف‌کنندگان از سلامت و کیفیت محصول و ارتقا صادرات می‌گردد. علی‌رغم تحقیقات انجام‌شده، کنترل قارچ‌های توکسین‌زا هنوز هم به‌عنوان یک مسئله مهم در دو بخش اقتصادی و بهداشتی مطرح است. برای کنترل و حذف آفلاتوکسین عمدتاً از روش‌های شیمیایی و فیزیکی استفاده می‌شود. روش‌های فیزیکی، اغلب سبب کاهش ارزش‌های تغذیه‌ای در محصول می‌شوند. روش‌های شیمیایی که در راستای حذف توکسین‌های قارچی اجرا می‌شود نیز مشکلاتی همچون انباشت ترکیبات شیمیایی مضر در محصولات غذایی، ورود این ترکیبات مضر در زنجیره غذایی و احتمال به‌وجودآمدن گونه‌های مقاوم را در پی دارند (۳)؛ بنابراین، به‌کارگیری استراتژی‌های کم‌خطرتر موردتوجه قرار دارد و اخیراً مطالعات بر رویکردهای بیولوژیکی متمرکز شده است؛ به‌عنوان مثال به‌کارگیری سویه‌های غیرسمی اسپرژیلوس، کنترل بیولوژیک با استفاده از مخمر، باکتری‌ها و قارچ‌ها و استفاده از ترکیبات گیاهی و معدنی برای کنترل آلودگی‌های توکسینی (۸، ۹).

گیاهان همواره متابولیت‌های ثانویه بسیاری با ساختارهای مختلف تولید می‌کنند که در کنترل قارچ‌های بیماری‌زا مانند گونه‌های اسپرژیلوس بسیار مؤثر بوده‌اند (۱۰، ۱۱). استفاده از گیاه و ترکیبات گیاهی مانند اسانس، عصاره‌های گیاهی و مشتقات خالص‌شده گیاهی برای کنترل پاتوژن‌های گیاهی

مختلف به خصوص در دانه‌ها یافت می‌شود. از جمله آلکالوئیدهای مهم آن می‌توان به هارمین، هارمالین و هارمالول اشاره کرد. هارمالین از نظر داروشناسی دارای خاصیت قارچ‌کش و باکتری‌کشی می‌باشد. دانه گیاه اسپند در ایران از دیرباز به‌عنوان یکی از گیاهان دارویی مهم در طب سنتی مطرح بوده است. در ایران و ترکیه دود اسپند به‌عنوان یک عادت فرهنگی متداول و یک عامل ضدعفونی‌کننده به‌کار می‌رود (۳۰). در مطالعات جدید اثرات متعددی از جمله ضد میکروبی، ضد تومور و مهارکننده فعالیت مونوآمینوآکسیدازی برای اسپند ذکر شده است که اغلب به وجود ترکیبات آلکالوئیدی در آن نسبت داده می‌شود (۳۱، ۳۲، ۳۳). همچنین در مطالعات دیگر اثر عصاره گیاه اسپند در کاهش تولید آفلاتوکسین بیان شده است (۳۴).

در تحقیق حاضر با استفاده از متون گیاهان دارویی و کتب طب سنتی نظیر مخزن الادویه، معرفت فلاح و قانون به بررسی گیاهانی پرداخته شد که دارای اثرات ضد میکروبی قابل توجهی باشند و دو گیاه دارویی گلپر و اسپند براساس خصوصیات ذکر شده انتخاب شدند (۲۵، ۲۶، ۳۵) و مکانیسم مولکولی نحوه عملکرد آن‌ها بر مسیر بیوستنز AFB1 با بررسی بیان دو ژن کلیدی خوشه ژنی تولید آفلاتوکسین (afm) و (afIP) و یک ژن تنظیمی aflR، توسط Real-time PCR ارزیابی شد. هدف از این مطالعه، بررسی مهار بیوستنز AFB1 با استفاده از گیاهان دارویی انتخاب شده از منابع طب سنتی ایران است که علاوه بر خواص درمانی، قابلیت افزودن به ترکیبات غذایی را دارند. از این رو یافته‌های این تحقیق می‌تواند در صنایع غذایی و دامی کاربردهای ارزشمندی داشته باشد و به‌عنوان افزودنی به غذاهای مستعد آلودگی به این قارچ و سم مورد استفاده قرار گیرد.

### مواد و روش‌ها:

سویه قارچی و شرایط کشت با توجه به اثرات اثبات شده درمانی ترکیبات این دو گیاه در مطالعات جدید و اثبات تأثیرات ضد میکروبی این ترکیبات در کنترل آفلاتوکسین باعث شکل‌گیری این فرضیه می‌شود که همراه‌سازی این ترکیبات با

ایران پیشینه‌ای طولانی در زمینه طب سنتی و استفاده از گیاهان دارویی در درمان بیماری‌ها دارد. دانش سرشار ایرانیان در استفاده از گیاهان دارویی و وجود منابع علمی معتبر می‌تواند راهکارها و دستاوردهای ارزشمندی را برای یافتن نوآوری‌های زیستی در زمینه‌های دارویی و غذایی به ارمغان بیاورد. گلپر ایرانی *H. persicum* گیاهی دارویی است و در زبان فارسی نام دیگر آن «انگدان» می‌باشد، اما عده‌ای آن را معرب کرده، «انجدان» نامیده‌اند (۲۳). در برخی منابع به این گیاه Angelina نیز گفته می‌شود که ممکن است از اسم عربی آن گرفته شده باشد. گلپر به‌طور گسترده‌ای به‌عنوان عطر و طعم در صنایع غذایی استفاده می‌شود. در طب سنتی ایران از گلپر به‌عنوان داروی ضد عفونی‌کننده، ضد درد، ضد سوءهاضمه و ضد نفخ استفاده می‌شود. در کتاب‌های طب سنتی بیان شده که مصرف بیش از اندازه گیاه گلپر باعث سقط جنین می‌شود. مطالعات فارماکولوژیک نشان می‌دهد این گیاه خواص ضد میکروبی، ضد التهابی، ضد نفخ، ضد تشنج و شیرآور دارد (۲۳). گلپر دارای اثرات ضد میکروبی زیادی است. از دود حاصل از سوختن دانه خشک‌شده گلپر به همراه اسپند برای ضد عفونی کردن محیط استفاده می‌شود (۲۴). مطالعه رزاقی ابیانه و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان داد که عصاره میوه گلپر در غلظت ۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر باعث کاهش چشمگیر ارگوسترول قارچ و مهار تولید آفلاتوکسین B1 و G1 در قارچ *A. parasiticus* می‌شود (۲۴).

به کاربرد اسپند با نام علمی *P. harmala* برای مصارف دوددهی و ضد عفونی هوای محیط اشاره شده است (۲۵). در طب عامه مردم کندر را با اسپند می‌سوزانند و به‌عنوان خوشبوکننده و تمیزکننده هوا به کار می‌برند. در واقع اسپند به‌عنوان ضد عفونی‌کننده مصرف می‌شد (۲۶). برای گیاه دارویی اسپند در منابع طب سنتی خواص ضد درد، ضد نفخ، ضد انعقاد خون و ضد میکروبی ذکر شده است. همچنین از دود آن برای درمان درد دندان و دور کردن پشه استفاده می‌شد (۲۵، ۲۹). در قدیم از عصاره دانه اسپند برای دور کردن پشه استفاده می‌شده است (۲۶، ۲۷، ۲۸). گیاه اسپند در بردارنده مواد ضد میکروبی از نوع فلاونوئیدها و آلکالوئیدها است که این مواد در بخش‌های

جهت عصاره‌گیری به ازای هر ۱۰۰ گرم گیاه خشک ۱۰۰۰ میلی‌لیتر حلال (آب مقطر و اتانول) اضافه شد. برای اینکه بهترین استخراج مواد مؤثره انجام گیرد با توجه به ترکیبات قطبی و غیرقطبی هر گیاه درصد متفاوتی از آب و اتانول به‌عنوان حلال استفاده شد (جدول ۱). گیاهان به مدت ۴۸ ساعت در حلال غوطه‌ور و با دور rpm220 شیک شدند. پس از فیلتراسیون عصاره‌های تام توسط قیف بوخنر (قطر ۹۰ میلی‌متر) و کاغذ فیلتر واتمن شماره ۱، عصاره‌ها با استفاده از اواپراتور تغلیظ سپس توسط دستگاه فریزدرایر خشک شدند. در ابتدا ۵ غلظت از عصاره‌ها جهت تعیین حداقل غلظت بازرانده تست شد سپس ۳ غلظت برای هر عصاره جهت انجام آزمایش‌ها انتخاب گردید. برای تهیه رقت‌های مختلف هر عصاره از آب و اتانول مطابق با نسبت‌های استخراج استفاده شد. از حداکثر غلظت استفاده‌شده از اتانول در تهیه رقت‌ها به‌عنوان کنترل استفاده شد تا از عدم تأثیر آن در رشد قارچ و تولید آفلاتوکسین اطمینان حاصل گردد. برای هر غلظت، سه تکرار در نظر گرفته شد و محیط‌های کشت پس از تلقیح با اسپور قارچ به مدت ۷ روز در دمای ۲۸ درجه انکوبه گردید. محیط کشت عصاره مخمر و ساکارز (YES) برای آزمایش تولید آفلاتوکسین در این مطالعه استفاده شد.

مواد غذایی مستعد این آلودگی در غذای انسان و دام علاوه بر اثرات درمانی، می‌تواند جهت پیشگیری و کاهش عوارض آفلاتوکسین نیز مؤثر باشد.

سویه قارچی *A. flavus* NRRL 3357 از کلکسیون میکروب بخش بیماری‌شناسی گیاهی دانشگاه ساپینزا ایتالیا تهیه شد. کلیه آزمایش‌ها در دانشگاه سپینزا شهر رم ایتالیا انجام شد. این سویه جهت انجام آزمایش‌ها بر روی محیط کشت *Potato Dextrose Agar (PDA)* در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت هفت روز کشت داده شد. سوسپانسیون اسپور در آب و توین ۸۰ (۰/۰۵ درصد) آماده شد. تراکم اسپور برای دستیابی به غلظت نهایی  $1 \times 10^3$  کنیدی در میلی‌لیتر توسط لام هموسیتمتر محاسبه شد (۱).

#### گیاهان دارویی، آماده‌سازی عصاره‌های گیاهی و تعیین حداقل غلظت بازراندگی

دو گیاه دارویی گلپر (*H. persicum*) و اسپند (*P. harmala*) برای این مطالعه انتخاب شدند. گیاهان مورد استفاده در این مطالعه از زیستگاه‌های طبیعی آن‌ها در ایران جمع‌آوری و در بخش هرباریوم دانشکده داروسازی دانشگاه تهران شناسایی و کد هرباریومی برای آن‌ها صادر شد (جدول ۱).

جدول ۱. کد هرباریومی و درصد حلال‌های مورد استفاده جهت عصاره‌گیری

| نام عمومی گیاه | نام علمی                  | کد هرباریومی | حلال و نسبت حلال          |
|----------------|---------------------------|--------------|---------------------------|
| گلپر           | <i>Heracleum persicum</i> | PMP-762      | Water and Ethanol (50/50) |
| اسپند          | <i>Peganum harmala</i>    | PMP-763      | Water and Ethanol (70/30) |

گرفت (جدول ۲). همه محیط‌های کشت به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو و استریل شدند. محیط‌های کشت با محیط کشت PDB به‌عنوان یک محیط کشت عمومی برای رشد قارچ مقایسه شدند.

محیط کشت مساعد برای رشد قارچ *A. flavus* تولید آفلاتوکسین B1 برای تعیین بهترین محیط کشت برای تولید آفلاتوکسین، شش محیط کشت پس از گذشت ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار

جدول ۲. محیط کشت‌ها جهت رشد قارچ *A. flavus* تولید آفلاتوکسین و ترکیبات آن‌ها

| محیط کشت                                     | ترکیبات تشکیل دهنده   |
|--|---|
| <b>Potato Dextrose Broth (PDB)</b>           | (20 g Dextrose and 4 g Potato starch) for 1 L of media  |
| <b>Sabouraud Dextrose Broth (SDB)</b>        | (40 g Dextrose (Glucose) and 10 g Peptone) for 1 L of media   |
| <b>Czapek Yeast Extract (CYE)</b>            | (30 g Sucrose, 5 g Yeast extract, Czapek concentrate 10 ml and 1 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) for 1 L of media |
| <b>Malt Extract Broth (MEB)</b>              | (17 g Malt Extract, 3 g Peptone) for 1 L of media   |
| <b>Yeast Extract Peptone Dextrose (YEPD)</b> | (10 g Yeast Extract, 20 g Dextrose, 20 g Peptone) for 1 L of media  |
| <b>Yeast Extract Sucrose (YES)</b>           | (20 g Yeast Extract, 20 g Sucrose, 1 g Potassium dihydrogen Phosphate and 0.5 g Magnesium sulphate) for 1 L of media  |

### مهاری رشد قارچ *A. flavus*

ابتدا برای هر عصاره غلظت مهارکنندگی سنجیده شد، سپس ۳ غلظت از هر عصاره که مهارکنندگی کامل قارچ آسپرژیلوس را نداشت، انتخاب شدند. این غلظت‌ها برای عصاره گلپر (۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و برای عصاره اسپند (۲، ۴ و ۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) بودند. برای بررسی میزان مهار رشد قارچ، در فالكون‌های ۵۰ میلی‌لیتری، ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت استریل Yeast Extract Sucrose (YES) ریخته و ۳ غلظت مختلف از هر عصاره به محیط‌ها اضافه و شیک گردید. سپس هر فالكون با ۴۰ میکرولیتر سوسپانسیون اسپور در آب و توین ۸۰ (۰/۰۵ درصد) تلقیح شد. برای هر تیمار سه تکرار زیستی در نظر گرفته شد. فالكون‌ها به مدت ۷ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در تاریکی انکوبه شدند و پس از گذشت دوره انکوباسیون، میسلیوم‌های قارچی توسط کاغذ فیلتر واتمن شماره ۱ جدا شد و توسط دستگاه فریزدرایر مدل Alpha 1-4 LDplus خشک شدند و متعاقباً ترازوی حساس ۰/۰۰۰۱ گرم Sartorius وزن خشک آن‌ها را اندازه‌گیری کرد. درصد مهار رشد قارچ توسط فرمول زیر محاسبه شد که در آن A وزن خشک نمونه کنترل (نمونه تیمارنشده با عصاره) را نشان می‌دهد و B وزن خشک نمونه تیمارنشده با عصاره‌ها می‌باشد:

$$\text{درصد مهار رشد قارچ} = 100 \times \frac{A-B}{A}$$

استخراج و شناسایی آفلاتوکسین B1 توسط دستگاه

LC-MS

آفلاتوکسین B1 از محیط کشت YES با حجم مساوی اتیل استات استخراج شد. محیط کشت‌های داخل هر فالكون با حجم مساوی اتیل استات مخلوط و دو بار عصاره‌گیری از هر محیط کشت انجام شد. پس از اضافه‌کردن اتیل استات، محیط کشت‌ها دو بار به مدت ۳ دقیقه با فاصله زمانی ۳۰ دقیقه ورتکس شدند. سپس به مدت ۴ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰g سانتریفیوژ شده و فاز بالایی به ویال جدید منتقل گردید. عصاره‌ها پس از استخراج در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و توسط دستگاه Sample concentrator کمپانی Stuart خشک شدند. عصاره‌های خشک‌شده مجدداً در ۱۰۰ میکرولیتر متانول حل و پس از سانتریفیوژ، ۸۰ میکرولیتر از آن به ویال‌های HPLC منتقل شدند.

تجزیه و تحلیل LC-MS توسط دستگاه HPLC Infinity Agilent 1200 متصل به یک طیف‌سنج جرمی Agilent G6420 Triple Quadrupole و مجهز به یک منبع یونیزاسیون Agilent API-Electrospray انجام شد. جداسازی کروماتوگرافی توسط Zorbax Eclipse XDB-C18، قطر داخلی ۴/۶×۵۰ میلی‌متر، اندازه ذرات ۱/۸ میکرومتر، در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و حجم تزریق ۵ میکرولیتر انجام شد. فاز متحرک شامل A: متانول/آب/اسید استیک ۱۰:۸۹:۱ (V/V/V) و B: متانول/آب/اسید استیک ۹۷:۲:۱ (V/V/V) و هر دو حاوی ۵ میلی‌مولار آمونیوم استات بود. زمان کل ۲۰ دقیقه با سرعت جریان ۰/۴ میلی‌لیتر در دقیقه بود.

(جدول ۳). به منظور تعیین میزان بیان ژن‌های مورد بررسی در مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین، از واکنش‌های کمی Real Time PCR مبتنی بر رنگ فلورسنس SYBR Green توسط دستگاه LineGene 9620 کمپانی Bioer استفاده شد. ژن  $\beta$ -tubulin به عنوان مرجع مورد استفاده قرار گرفت. واکنش نهایی در حجم ۱۰ میکرولیتر که مشتمل بر ۱ میکرولیتر cDNA، ۵ میکرولیتر SYBR Green، ۰/۵ میکرولیتر از هر آغازگر و ۳ میکرولیتر Milli Q Water تا حجم ۱۰ میکرولیتر انجام شد. شرایط واکنش و الگوی دمایی به صورت زیر بود: ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و سپس ۴۰ چرخه شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ ثانیه و سپس ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و در انتها ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه و ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ ثانیه (جدول ۴). در این مطالعه، تغییرات بیان ژن‌ها در سه تکرار دستگاهی و سه تکرار زیستی و با استفاده از روش  $\Delta\Delta CT=2$  محاسبه و سپس به صورت درصد ارزیابی شد.

### استخراج RNA و واکنش زنجیره پلیمرز نسخه‌برداری معکوس (RT-PCR)

برای آنالیزهای بیان ژن، میسلیوم‌های قارچ ابتدا در بافر سرد Phosphate-Buffered Saline (PBS) شست‌وشو و سپس توسط دستگاه فریزدرایر خشک شد. استخراج RNA از میسلیوم قارچی با استفاده از TRIZOL® (سیگما-آلدیچ، ایالات متحده آمریکا) و طبق دستورالعمل سازنده انجام شد. سپس تیمار با آنزیم DNase I به منظور حذف DNA ژنومی انجام شد. برای تعیین کمیت RNA، از دستگاه نانودراپ (Thermo Scientific™ NanoDrop™ OneC) در طول موج ۲۸۰/۲۶۰ نانومتر استفاده شد و برای تعیین کیفیت RNA استخراج‌شده، الکتروفورز با استفاده از ژل آگارز (۱/۲ درصد آگارز) انجام شد. سپس واکنش نسخه‌برداری معکوس از RNA‌های استخراج در حضور آغازگرهای تصادفی و با استفاده از کیت SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit و مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده (Bioline) انجام گردید.

تجزیه و تحلیل بیان ژن توسط Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR پرایمرها توسط Primer-BLAST طراحی و توسط نرم‌افزار Oligo Analyzer 3.1 بررسی و اعتبارسنجی شد

جدول ۳. ژن‌های کلیدی موجود در خوشه ژنی آفلاتوکسین و پرایمرهای طراحی شده برای آن‌ها

| Gene                | Primer pairs | Primer sequence (5'-3') | Annealing temperature (°C) | PCR Product size (bp) |
|---------------------|--------------|-------------------------|----------------------------|-----------------------|
| <i>aflR</i>         | F            | CACCCCTTGCGATTAGTGT     | 60.04                      | 167                   |
|                     | R            | GTTGATCGATCGGCCAGTCT    | 59.90                      |                       |
| <i>aflM</i>         | F            | CACCGTCTCCGCCATTAAC     | 60.04                      | 137                   |
|                     | R            | TGGTGAACACGCCATTCC      | 60.11                      |                       |
| <i>aflP</i>         | F            | CAGAGCGTCCGAATCCCTTT    | 57.30                      | 141                   |
|                     | R            | GGTAGACCTCTCCTTCCCGT    | 57.17                      |                       |
| <i>tubulin beta</i> | F            | GGAAGTCAGAAGCAGCCATC    | 59.89                      | 211                   |
|                     | R            | GTGACCACCTGTCTCCGTTT    | 58.62                      |                       |

جدول ۴. شرایط واکنش برای هر ژن در واکنش Real Time PCR

| Gene                | Initial denaturation |        | Denaturation |      | Annealing |      | Extension |       | Final extension |       |
|---------------------|----------------------|--------|--------------|------|-----------|------|-----------|-------|-----------------|-------|
|                     | Temp                 | Time   | Temp         | Time | Temp      | Time | Temp      | Time  | Temp            | Time  |
| <i>aflR</i>         | 95                   | 10 min | 95           | 15 s | 58        | 30 s | 72        | 2 min | 72              | 5 min |
| <i>aflM</i>         | 95                   | 10 min | 95           | 15 s | 60        | 30 s | 72        | 2 min | 72              | 5 min |
| <i>aflP</i>         | 95                   | 10 min | 95           | 15 s | 57        | 30 s | 72        | 2 min | 72              | 5 min |
| <i>tubulin beta</i> | 95                   | 10 min | 95           | 15 s | 60        | 30 s | 72        | 2 min | 72              | 5 min |

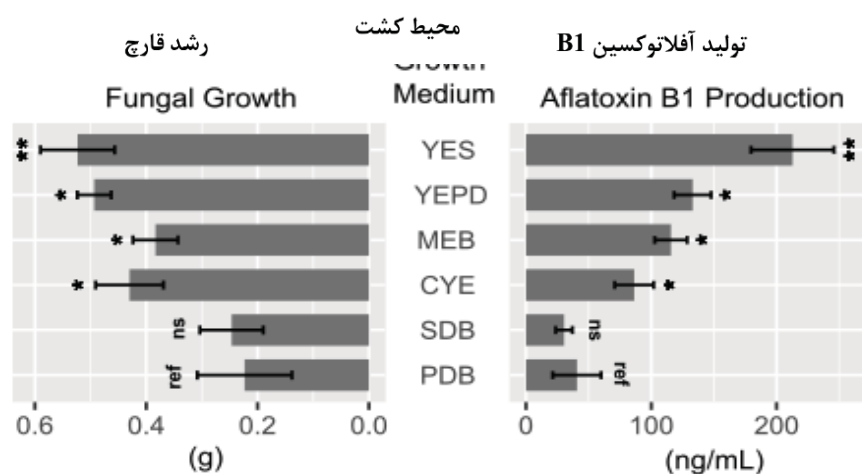
ارزیابی بهترین محیط کشت برای رشد قارچ *A. flavus* و همچنین تولید آفلاتوکسین B1 براساس وزن خشک میسلیوم قارچی و میزان تولید آفلاتوکسین B1 نشان داد میزان رشد قارچ و تولید آفلاتوکسین B1 در محیط کشت Yeast Extract Sucrose (YES) نسبت به محیط کشت کنترل (PDB) در سطح  $p\text{-value} < 0.001$  تفاوت چشمگیری داشت. از این رو این محیط کشت از جهت میزان رشد قارچ *A. flavus* و تولید آفلاتوکسین B1 محیط مناسبتری است که برای انجام تستها استفاده شد (نمودار ۱).

### تجزیه و تحلیل داده‌ها

در این مطالعه، بررسی مهار رشد قارچ *A. flavus* و همچنین تغییرات بیان ژن‌ها در سه تکرار دستگاهی و سه تکرار زیستی انجام پذیرفت. تمام تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از آزمون تی (T-test) با دو نمونه مستقل توسط نرم‌افزار آماری R نسخه ۳،۴ انجام شد. آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی ترتیب داده شدند.

### یافته‌ها:

ارزیابی بهترین محیط کشت برای رشد قارچ *A. flavus* و تولید آفلاتوکسین B1



نمودار ۱. میزان رشد میسلیوم قارچی و تولید آفلاتوکسین B1 بر روی محیط کشت‌های مختلف پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون در ۲۸ درجه.

ns = بدون معنی؛ \* معنی‌دار در سطح  $p\text{-value} < 0.05$ ؛ \*\* معنی‌دار در سطح  $p\text{-value} < 0.001$

### ارزیابی تأثیر عصاره‌ها بر رشد قارچ و تولید

#### آفلاتوکسین B1

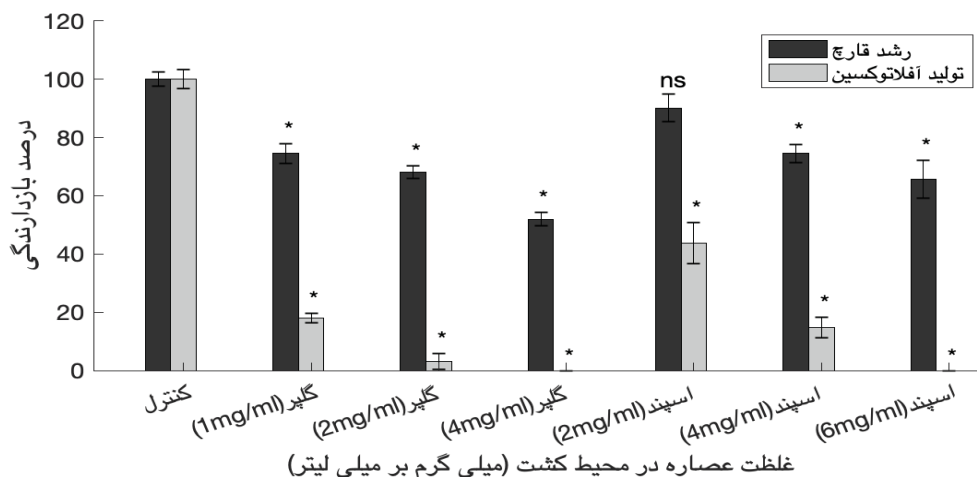
ارزیابی‌ها نشان داد که میزان بازدارندگی از رشد میسیلیوم قارچ *A. flavus*، برای غلظت‌های ۱، ۲، ۴ (mg/mL) عصاره گلپر و غلظت‌های ۴ و ۶ (mg/mL) عصاره اسپند، در سطح  $p\text{-value} < 0.05$  نسبت به تیمار کنترل (شاهد آلوده تیمارنشده با عصاره) معنی‌دار بود، اگرچه میزان این کاهش در تمامی غلظت‌های هر دو عصاره کمتر از ۵۰ درصد مشاهده شد. میزان مهارکنندگی رشد قارچ به ترتیب حدود ۲۶٪، ۳۲٪ و ۴۹٪ برای غلظت‌های ۱، ۲، ۴ (mg/mL) گلپر و ۱۰٪، ۲۶٪ و ۳۵٪ برای غلظت‌های ۲، ۴، ۶ (mg/mL) اسپند می‌باشد.

در بررسی میزان تولید آفلاتوکسین B1، تمامی غلظت‌ها در سطح  $p\text{-value} < 0.05$  کاهش معنی‌داری نسبت به تیمار کنترل نشان دادند. گلپر در غلظت ۴ و اسپند در غلظت ۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر درصد مهارکنندگی ۱۰۰٪ تولید آفلاتوکسین B1 را نشان دادند (نمودار ۲).

### تأثیر عصاره‌های گیاهی بر روی بیان ژن‌های کلیدی

#### مسیر بیوستنز آفلاتوکسین B1

در این تحقیق دو ژن aflM و aflP موجود مراحل انتهایی خوشه ژنی بیوستنز آفلاتوکسین B1 و یک ژن تنظیمی aflR جهت انجام بررسی‌ها استفاده شد. سطح بیان ژن‌های aflM، aflP و aflR در قارچ *A. flavus* تیمار شده با غلظت‌های مختلف دو عصاره گلپر و اسپند در نمودار ۳ نشان داده شده است. در مقایسه با شاهد، تمام ژن‌ها توسط غلظت‌های مختلف دو عصاره در سطوح مختلف تحت تأثیر قرار گرفت. از میان سه ژن مورد بررسی، سطح رونویسی ژن aflP بیشترین کاهش را نشان داد و میزان آن در گلپر در غلظت ۴ و اسپند در غلظت ۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر حدود ۹۹ درصد بود. سطح رونویسی ژن aflP در تمامی غلظت‌های ۱، ۲ و ۴ (mg/mL) از عصاره گلپر و غلظت‌های ۲، ۴ و ۶ (mg/mL) عصاره اسپند در سطح  $p\text{-value} < 0.05$  به صورت چشمگیری کاهش داشت. ژن aflM در غلظت‌های ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره گلپر و غلظت‌های ۴ و ۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره اسپند در سطح  $p\text{-value} < 0.05$  کاهش چشمگیری داشت.

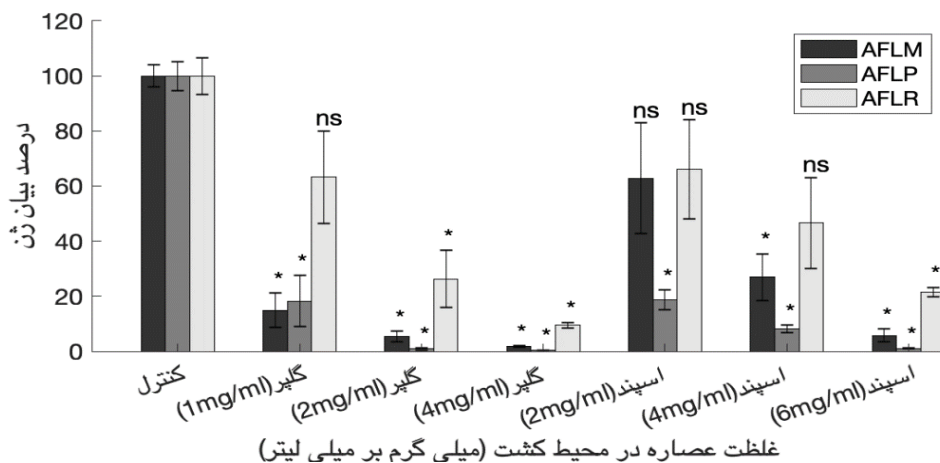


نمودار ۲. تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره‌ها بر تولید (AFB1) و رشد قارچ در *A. flavus* NRRL 3357. نتایج به‌عنوان درصد مهارکنندگی نسبت به کنترل (شاهد آلوده تیمارنشده با عصاره) بیان شده است. AFB1 توسط LC-MS و رشد قارچ براساس وزن خشک میسیلیوم برآورد شد. هر دو بررسی در روز ۷ و در سه تکرار بیولوژیکی انجام گرفت. ns = بدون معنی؛ \*معنی‌دار در سطح  $p\text{-value} < 0.05$ .



عصاره‌های گلپر و اسپند در غلظت‌های مورد استفاده باعث کاهش بیان ژن‌های aflM, aflP, aflR و aflR موجود در خوشه ژنی آفلاتوکسین B1 و در نهایت به کاهش تولید آفلاتوکسین B1 در ۷ روز پس از تیمار منجر می‌شود.

ژن تنظیمی aflR فقط در غلظت‌های ۲ و ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره گلپر و ۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره اسپند به ترتیب با ۷۴٪، ۹۰٪ و ۷۹٪ درصد در سطح  $p\text{-value} < 0.05$  کاهش چشمگیری را نشان داد. این نتایج نشان می‌دهد که



نمودار ۳. تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره‌ها بر میزان بیان ژن‌های aflM, aflP, aflR و aflR در محیط کشت *A. flavus* NRRL 3357. Saccharose پس از ۷ روز. نتایج به‌عنوان درصد بیان نسبت به میزان بیان ژن در تیمار کنترل (شاهد آلوده تیمار نشده با عصاره) بیان شده است. ns = بدون معنی؛ \* معنی‌دار در سطح  $p\text{-value} < 0.05$

بنابراین نمایانگر رابطه میان دوز عصاره، میزان بیان ژن و تولید آفلاتوکسین B1 است.

خوشه ژنی AFB1 توسط دو ژن تنظیم‌کننده داخلی aflR و aflS تنظیم می‌شود که فعال‌سازی آن‌ها به‌طور مستقل از یکدیگر و توسط ژن‌های تنظیم‌کننده‌های خارجی اداره می‌شود (۳۶). در این مطالعه نشان داده شد که سطح بیان همه ژن‌های aflM, aflP, aflR موجود در خوشه ژنی آفلاتوکسین به‌طور کلی در غلظت‌های مختلف عصاره‌های گلپر و اسپند تحت تأثیر قرار گرفت و کاهش پیدا کرد. این کاهش برای ژن aflP که یکی از ژن‌های مراحل انتهایی سنتز آفلاتوکسین در خوشه ژنی می‌باشد از سایر ژن‌ها بیشتر بود.

همان‌طور که گفته شد در این مطالعه کاهش بیان ژن تنظیمی aflR کمتر از دو ژن دیگر و فقط در غلظت‌های ۲ و ۴

## بحث:

در این مطالعه، مهار تولید آفلاتوکسین B1 را به هنگام تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره‌های گلپر و اسپند بررسی کردیم و با استفاده از تجزیه و تحلیل آنالیز LC-MS و RT-qPCR مکانیسم این عصاره‌ها را در برابر تولید آفلاتوکسین B1 نشان دادیم. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که به‌طور کلی افزودن دوزهای خاصی از عصاره‌های مطالعه‌شده، تولید آفلاتوکسین B1 را سرکوب می‌کند بدون اینکه رشد *A. flavus* متوقف شود. علاوه بر این، با افزایش دوز، بیان ژن‌های مورد مطالعه کاهش یافته یا خاموش شد و در نهایت تولید آفلاتوکسین B1 کاهش یافت یا متوقف شد. این یافته‌ها ارتباط بین نتایج تجزیه و تحلیل LC-MS و RT-qPCR را نشان می‌دهد و

میلی گرم در میلی لیتر عصاره گلپر و ۶ میلی گرم در میلی لیتر عصاره اسپند در سطح  $p\text{-value} < 0.05$  کاهش چشمگیری را نشان داد. این موضوع را می توان به وظیفه و نقش تنظیمی این ژن نسبت داد و این گونه توجیه کرد که با توجه به اینکه بیان ژن های تنظیمی پایدارتر است حتی کاهش کم در بیان ژن تنظیمی *aflR* می تواند بر بیان سایر ژن های دخیل در مسیر بیوستنز آفلاتوکسین مؤثر باشد و بنابراین از این طریق نیز بر کاهش تولید آفلاتوکسین تأثیرگذار است. در عین حال با توجه به نتایج آنالیز LC-MS می توان نتیجه گرفت ژن تنظیمی *aflR* نسبت به سایر ژن ها هماهنگی کمتری با میزان تولید *AFB1* دارد و از این رو برای بررسی مکانیسم مهارکنندگی آفلاتوکسین تحت تأثیر عصاره های مطالعه شده از کارایی کمتری برخوردار است.

در مطالعات گذشته نشان داده شده است که ترکیبات طبیعی می توانند با مکانیسم کاهش بیان ژن موجب مهار سنتز مایکوتوکسین ها شوند. Kong و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان دادند که بیان دو ژن تنظیمی *aflR* و *aflS*، بیان ژن های خوشه ژنی *AFB1* را تحت تأثیر قرار می دهد و در تشکیل آن نقش دارند (۳۸). در مطالعه دیگر نشان داده شد که کورکومین به وسیله کاهش سطح بیان ژن های بیوستنز آفلاتوکسین مانند *pkSA*, *ver-1*, *nor-1* و *aflR* تولید *AFB1* را در *A. parasiticus* مهار کرد (۳۹). یحیی رعیت و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان دادند که اسانس *Zataria multiflora* باعث کاهش سطح بیان ژن های *aflD*, *aflM* و *aflP* در *A. parasiticus* شد (۴۰). در تحقیقات دیگری بیان شده است که پپیرین تقریباً با مهار بیان همه ژن های شرکت کننده در مسیر بیوستنز آفلاتوکسین تولید *AFB1* در *A. flavus* را مهار کرد (۴۱).

همچنین در مطالعات گوناگونی اثر ضد میکروبی و ضد قارچی گیاهان گلپر و اسپند نشان داده شده است (۳۰، ۳۳، ۴۲، ۴۳) با وجود این تا کنون مطالعه جامعی بر روی تأثیر این دو گیاه بر کنترل آفلاتوکسین و بررسی مکانیسم مولکولی آن صورت پذیرفته است.

این مطالعه کارایی عصاره دو گیاه دارویی گلپر و اسپند را در کنترل تولید آفلاتوکسین *BI* در سطح ژن نشان می دهد. بر اساس مطالعه انجام شده نتیجه می گیریم که کاهش بیوستنز آفلاتوکسین به دلیل کاهش سطح بیان ژن های اصلی موجود در خوشه ژنی بیوستنز آفلاتوکسین در اثر غلظت های بیان شده عصاره های گلپر و اسپند می باشد. با وجود این، باید توجه داشت که این بدان معنا نیست که این ژن ها هدف مولکولی مستقیم عصاره های گیاهی هستند. آن ها ممکن است از طریق چندین مکانیسم سلولی، از جمله سیگنالینگ سلولی، استرس اکسیداتیو و... روند تولید آفلاتوکسین را مختل کنند. نتایج این پژوهش به علت کارابودن این ترکیبات با وجود عدم تأثیر بر تنوع زیستی، اهمیت بسزایی در ایمنی زیستی دارد؛ بنابراین با توجه به خواص ضد میکروبی و نگهدارندگی، این ترکیبات می توانند به عنوان مواد ایمن تر از ترکیبات شیمیایی خطرزا به غذای انسان و دام اضافه و جایگزین سموم پرخطر شیمیایی گردند (۱۶). با توجه به افزایش تقاضا برای استفاده از غذاهای طبیعی تر، شناسایی و معرفی طیف وسیع تری از ترکیبات طبیعی مؤثر می تواند برای کاهش مصرف مواد نگهدارنده مصنوعی مفید باشد. تدوین تکنیک های قابل اعتماد جدید برای از بین بردن آلودگی آفلاتوکسین مواد غذایی اهمیت بسیاری برای صنایع غذایی و دامی دارد. همچنین می توان از این نگرش در کاهش و تجزیه آفلاتوکسین در داروهای گیاهی مستعد به آلودگی با آفلاتوکسین بهره برد.

اثرات ضد میکروبی و ضدتوکسینی این عصاره می تواند حاکی از پتانسیل این ترکیبات به عنوان نگهدارنده های طبیعی مواد غذایی باشد و به کاهش استفاده از نگهدارنده های شیمیایی کمک کند. تفاوت در میزان اثرات ضد آفلاتوکسینی این دو عصاره مربوط به ترکیبات مؤثره هر گیاه است که موجب خصوصیات بیولوژیکی متفاوت می شود. شایان ذکر است در مورد هر دو گیاه حداکثر دوزهای مجاز مصرف در انسان و دام باید در نظر گرفته شود. استفاده از دوزهای مناسب گیاه گلپر به علت خواص ارگانولپتیک و طعم مطلوب آن در فرآورده های غذایی برای جلوگیری از آلودگی های قارچی و

آلودگی آفلاتوکسین B1 به هنگام مصرف و ذخیره‌سازی در مواد غذایی مورد مصرف برای انسان و دام باشد. علاوه بر این، در مطالعه ما دو ژن ساختاری (afIP و afIM) و ژن تنظیمی (afIR) درگیر در بیوسنتز آفلاتوکسین B1 تأییدی بر مکانیسم کنترل این عصاره‌های گیاهی محسوب می‌شوند.

با توجه به اثرات اثبات‌شده درمانی ترکیبات این دو گیاه در مطالعات جدید، اثبات تأثیرات ضد میکروبی این ترکیبات در کنترل آفلاتوکسین باعث شکل‌گیری این فرضیه می‌شود که همراه‌سازی این ترکیبات با مواد غذایی مستعد این آلودگی در غذای انسان و دام علاوه بر اثرات درمانی، می‌تواند جهت پیشگیری و کاهش عوارض آفلاتوکسین نیز مؤثر باشد.

در این مطالعه عصاره تام گیاهان دارویی گلپر و اسپند بررسی شد و بررسی ترکیبات موجود در عصاره‌های گیاهی و خالص‌سازی آن‌ها و همچنین بررسی میزان مهار آفلاتوکسین هر یک از ترکیبات می‌تواند مطالعات تکمیلی خوبی برای این پژوهش باشد. همچنین پیشنهاد می‌گردد سایر ژن‌های مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین نیز بررسی شود. علاوه بر این برخی از جنبه‌های کاربردی استفاده از ترکیبات گیاهی در محصولات غذایی، به‌ویژه تأثیرات احتمالی آن‌ها بر ویژگی‌های حسی غذاها، ماندگاری آن‌ها و حفظ خاصیت ضد میکروبی در شرایط مختلف محیطی اهمیت دارد و بهتر است فرمولاسیون‌های غذایی نیز بررسی شوند. همچنین این ترکیبات قادر به اضافه‌شدن به خشکبار و غلات فرآوری‌شده که مستعد آفلاتوکسین هستند به‌ویژه در مورد غذای انسان و همچنین در کنجاله‌های دامی فرآوری‌شده می‌باشند و دوز مؤثره باید در مطالعات تکمیلی و با توجه به ترکیبات محصول مشخص شود.

مایکوتوکسینی، به‌تنهایی یا در کنار سایر نگهدارنده‌ها می‌تواند مؤثر واقع شود. با وجود این غلظت مؤثر ترکیبات گیاهی به‌عنوان نگهدارنده بسته به ترکیب مواد غذایی و خصوصیات فیزیکوشیمیایی آن‌ها ممکن است متفاوت از نتایج اولیه آزمایشگاهی باشد؛ به‌عنوان مثال، میزان پروتئین، چربی و آب آزاد موجود در محصول می‌تواند در فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ها تداخل ایجاد کند و در اغلب اوقات نیاز به استفاده از دوز متفاوت وجود دارد (۴۴). در این راستا مطالعاتی در مورد تأثیر ترکیبات گیاهی بر کاهش قابل‌توجه آلودگی آفلاتوکسین به‌وسیله استفاده از عصاره‌های گیاهی به‌صورت پوشش روی مغزها انجام شده است. در مطالعاتی که توسط کالی و همکاران انجام شد، نشان داده شده است که استفاده از عصاره *Cistus incanus* در ماکادامیا باعث می‌شود مصرف‌کنندگان در معرض آفلاتوکسین B1 کمتری قرار بگیرند. مطالعه آن‌ها نشان داد که عصاره *C. incanus*، آفلاتوکسین B1 را در محیط YES به میزان ۹۰/۱ درصد و در ماکادامیا ۸۵/۹ درصد مهار می‌کند (۴۵). مطالعه دیگر نشان داد که پاشش جداگانه سه عصاره گیاهی شامل دارچین، میخک و آویشن دناپی روی مغز پسته می‌تواند رشد قارچ‌های توکسین‌زا را کاملاً مهار و آفلاتوکسین تولیدشده در شرایط انبار را تخریب کند (۴۶).

به‌طور خلاصه، گیاهان در این مطالعه براساس خواص ضد میکروبی و همچنین سایر خصوصیات درمانی که گویای پتانسیل بالای به‌کارگیری این ترکیبات است، از منابع ارزشمند طب سنتی استخراج شد و مطالعه ما نشان می‌دهد که رویکردهای بیولوژیکی مبتنی بر استفاده از ترکیبات گیاهی می‌تواند به‌عنوان عوامل طبیعی نسبتاً بی‌خطر و مؤثری در برابر

## References:

1. Mohseni R, Noorbakhsh F, Moazeni M, Nasrollahi Omran A, Rezaie S. Antitoxin characteristic of licorice extract: the inhibitory effect on aflatoxin production in a *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Food Safety*. 2014 May;34(2):119-25.
2. Evtugyn G, Hianik T. Electrochemical immuno-and aptasensors for mycotoxin determination. *Chemosensors*. 2019 Mar;7(1):10.
3. Juma KK, Fulakeza RMJ, Ngeranwa JN, Ngugi MP, Mburu ND. Evidence based phytopharmacological potential of herbal extracts in post-ingestion management of mycotoxins in animal models. *Journal of Clinical Toxicology*. 2015; 5(4): 1000260.
4. Avinash W, Lakkawar K, Chattopadhyay S, Tripurari SJ. Experimental aflatoxin B1 toxicosis in young rabbits-a clinical and pathoanatomical study. *Slovenian Veterinary Research*. 2004; 41(2): 73-81.
5. Abu El-Saad AS, Mahmoud HM. Phytic acid exposure alters aflatoxinB1-induced reproductive and oxidative toxicity in albino rats (*Rattus norvegicus*). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2009 Sep 1;6(3):331-41.
6. Krausz C, Forti G. Clinical aspects of male infertility. Results and problems in cell differentiation. 2000;28:1-21
7. Paster N, Bullerman LB. Mould spoilage and mycotoxin formation in grains as controlled by physical means. *International Journal of Food Microbiology*. 1988 Dec 1;7(3):257-65.
8. Limaye A, Yu RC, Chou CC, Liu JR, Cheng KC. Protective and detoxifying effects conferred by dietary selenium and curcumin against AFB1-mediated toxicity in livestock: A review. *Toxins*. 2018 Jan;10(1):25.
9. Yu J. Current understanding on aflatoxin biosynthesis and future perspective in reducing aflatoxin contamination. *Toxins*. 2012 Nov;4(11):1024-57.
10. El Khoury R, Caceres I, Puel O, Bailly S, Atoui A, Oswald IP, *et al.* Identification of the anti-aflatoxinogenic activity of *Micromeria graeca* and elucidation of its molecular mechanism in *Aspergillus flavus*. *Toxins*. 2017 Mar;9(3):87.
11. Bluma R, Amaiden MR, Daghero J, Etcheverry M. Control of *Aspergillus section flavi* growth and aflatoxin accumulation by plant essential oils. *Journal of Applied Microbiology*. 2008 Jul;105(1):203-14.
12. Ponzilacqua B, Corassin CH, Oliveira CA. Antifungal activity and detoxification of aflatoxins by plant extracts: potential for food applications. *The Open Food Science Journal*. 2018 Oct 30;10(1): 24-32.
13. Thippeswamy S, Mohana DC, Abhishek RU, Manjunath K. Inhibitory activity of plant extracts on aflatoxin B1 biosynthesis by *Aspergillus flavus*. *Journal of Agricultural Science and Technology*. 2014 Sep 10;16(5):1123-32.
14. Mongalo NI, Dikhoba PM, Soyngbe SO, Makhafola TJ. Antifungal, anti-oxidant activity and cytotoxicity of South African medicinal plants against mycotoxigenic fungi. *Heliyon*. 2018;4(11):00973
15. Kenne GJ, Gummadidala PM, Omebeyinje MH, Mondal AM, Bett DK, McFadden S, *et al.* Activation of aflatoxin biosynthesis alleviates total ROS in *Aspergillus parasiticus*. *Toxins*. 2018;10(2):57.
16. Caceres I, El Khoury R, Medina Á, Lippi Y, Naylies C, Atoui A, *et al.* Deciphering the anti-aflatoxinogenic properties of eugenol using a Large-Scale q-PCR approach. *Toxins*. 2016;8(5):123.
17. Hua SS, Sarreal SB, Chang PK, Yu J. Transcriptional regulation of aflatoxin biosynthesis and conidiation in *Aspergillus flavus* by *Wickerhamomyces anomalus* WRL-076 for reduction of aflatoxin contamination. *Toxins*. 2019 Feb;11(2):81.
18. Kale SP, Milde L, Trapp MK, Frisvad JC, Keller NP, Bok JW. Requirement of LaeA for secondary metabolism and sclerotial production in *Aspergillus flavus*. *Fungal Genetics and Biology*. 2008 Oct 1;45(10):1422-9.

19. Bayram O, Krappmann S, Ni M, Bok JW, Helmstaedt K, Valerius O, Braus-Stromeier S, Kwon NJ, Keller NP, Yu JH, Braus GH. VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science*. 2008 Jun 13;320(5882):1504-6.
20. Calvo AM, Bok J, Brooks W, Keller NP. veA is required for toxin and sclerotial production in *Aspergillus parasiticus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004 Aug;70(8):4733-9.
21. Liang D, Xing F, Selvaraj JN, Liu X, Wang L, Hua H, *et al.* Inhibitory effect of cinnamaldehyde, citral, and eugenol on aflatoxin biosynthetic gene expression and aflatoxin B1 biosynthesis in *Aspergillus flavus*. *Journal of Food Science*. 2015 Dec;80(12):M2917-24.
22. El Khoury R, Caceres I, Puel O, Bailly S, Atoui A, Oswald IP, *et al.* Identification of the anti-aflatoxinogenic activity of *micromeria graeca* and elucidation of its molecular mechanism in *Aspergillus flavus*. *Toxins*. 2017 Mar;9(3):87.
23. Shokri H, Sharifzadeh A, Tamai IA. Anti-*Candida zeylanoides* activity of some Iranian plants used in traditional medicine. *Journal de Mycologie Médicale*. 2012 Sep 1;22(3):211-6.
24. Razzaghi-Abyaneh M, Saberi R, Sharifan A, Rezaee MB, Seifili R, Hosseini SI, *et al.* Effects of *heracleum persicum* ethyl acetate extract on the growth, hyphal ultrastructure and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus*. *Mycotoxin Research*. 2013 Nov 1;29(4):261-9.
25. Avicenna. *Al-Qanun fi al-Tibb* (The Canon of Medicine). Beirut: Alaalami Lil-Matboat Institute. 2005. [In Arabic].
26. Avicenna. *Al-Qanun fi al-Tibb* (The Canon of Medicine). Translated by Hameed HA. S.Waris Nawab. New Delhi: Senior Press Superintendent, Jamia Hamdard Printing Press; 1998. Vol.2, P:259.
27. Avicenna. *Al-Qanun fi al-Tibb* (The Canon of Medicine). Translated by Sharafkandi A. Tehran: Soroush Publications; 1997. Vol.3, P:102–103. [In Persian].
28. Jurjani SI. *Al-Aghrad al-Tibbiyah wa al-Mabahith al-Alaiyah*. Edited by Tajbakhsh H. 2<sup>nd</sup> ed. Tehran: University of Tehran; 2009. [In Persian].
29. Aqili Alavi Shirazi SMH. *Makhzan al-Adwiya*. Edited by Shams Ardekani MR, Rahimi R, Farjadmand F. Tehran: Tehran University of Medical Sciences Publication; 2009. P:207. [In Persian].
30. Zeinali T, Mohsenzadeh M, Rezaeian DR, Nabipoor R. In vitro assessment of antimicrobial effect of methanolic extract of *Peganum harmala* against some important foodborne bacterial pathogens. *Journal of Food Hygiene*. 2016;5(20):27-36.
31. Abdel-Fattah AF, Matsumoto K, Murakami Y, Gammaz HA, Mohamed MF, Watanabe H. Central serotonin level-dependent changes in body temperature following administration of tryptophan to pargyline- and harmaline-pretreated rats. *General Pharmacology: The Vascular System*. 1997 Mar 1;28(3):405-9.
32. Niroumand MC, Farzaei MH, Amin G. Medicinal properties of *Peganum harmala* L. in traditional Iranian medicine and modern phytotherapy: A review. *Journal of Traditional Chinese Medicine*. 2015 Feb 15;35(1):104-9.
33. Falahati M, Fateh F, Kiani J. Evaluation of antifungal effects of *Peganum harmala*. *Qom University of Medical Sciences Journal*. 2011 Sep 10;5(3):14-7.
34. Mehraban A, Abkhoo J, Dahmardeh E. Effect of extracts of *Capparis spinosa*, *Withania somnifera* and *Peganum harmala* on *Aspergillus flavus* growth and expression of major genes in aflatoxin biosynthetic pathway. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*. 2018 May 31;20(5):e64602.
35. Birjandi AA. *Ma'rifat-I Falahat*. Edited by Afshar I. Tehran: Written Heritage Publishing Institute; 2008. [In Persian].
36. Chang PK. The *Aspergillus parasiticus* protein AFLJ interacts with the aflatoxin pathway-specific regulator AFLR. *Molecular Genetics and Genomics*. 2003 Mar;268(6):711-9.
37. Ponzilacqua B, Corassin CH, Oliveira CA. Antifungal activity and detoxification of aflatoxins by plant extracts: Potential for food applications. *The Open Food Science Journal*. 2018 Oct 30;10(1):24-32.

38. Kong Q, Chi C, Yu J, Shan S, Li Q, Li Q, *et al.* The inhibitory effect of *Bacillus megaterium* on aflatoxin and cyclopiazonic acid biosynthetic pathway gene expression in *Aspergillus flavus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2014 Jun;98(11):5161-72.
39. Jahanshiri Z, Shams-Ghahfarokhi M, Allameh A, Razzaghi-Abyaneh M. Effect of curcumin on *aspergillus parasiticus* growth and expression of major genes involved in the early and late stages of aflatoxin biosynthesis. *Iranian Journal of Public Health*. 2012;41(6):72–79.
40. Yaharaeyat R, Khosravi AR, Shahbazzadeh D, Khalaj V. The potential effects of *Zataria multiflora* Boiss essential oil on growth, aflatoxin production and transcription of aflatoxin biosynthesis pathway genes of toxigenic *Aspergillus parasiticus*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2013;44(2):649-55.
41. Caceres I, El Khoury R, Bailly S, Oswald IP, Puel O, Bailly JD. Piperine inhibits aflatoxin B1 production in *aspergillus flavus* by modulating fungal oxidative stress response. *Fungal Genetics and Biology*. 2017 Oct 1;107:77-85.
42. Saravani Kh, Ramezannezhad P. Antimicrobial and antifungal activity of herbs and their active ingredients. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*. 2019;6(6):7-14.
43. Sepahvand A, Ezatpour B, Tarkhan F, Bahmani M, Khonsari A, Rafieian-Kopaei M. Phytotherapy in fungi and fungal disease: a review of effective medicinal plants on important fungal strains and diseases. *Int J Pharm Sci Res*. 2017 Nov 1;8:4473-95.
44. Firouzi R, Shekarforoush SS, Nazer AH, Borumand Z, Jooyandeh AR. Effects of essential oils of oregano and nutmeg on growth and survival of *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes* in barbecued chicken. *Journal of Food Protection*. 2007 Nov;70(11):2626-30.
45. Kalli V, Kollia E, Roidaki A, Proestos C, Markaki P. *Cistus incanus* L. extract inhibits aflatoxin B1 production by *aspergillus parasiticus* in macadamia nuts. *Industrial Crops and Products*. 2018 Jan 1;111:63-8.
46. Khorasani S, Azizi MH, Barzegar M, Hamidi-Esfahani Z, Kalbasi-Ashtari A. Inhibitory effects of cinnamon, clove and celak extracts on growth of *Aspergillus flavus* and its aflatoxins after spraying on pistachio nuts before cold storage. *Journal of Food Safety*. 2017 Nov;37(4):e12383.