

اثر اسانس‌های آویشن شیرازی و مرزه و مواد تیمول و کارواکرول بر *Fusarium graminearum* و داکسی نیوالنول*

EFFECT OF *Zataria multiflora* AND *Satureja hortensis* ESSENTIAL OILS, THYMOL AND CARVACROL ON GROWTH OF *Fusarium graminearum* ISOLATES AND DEOXYNIVALENOL PRODUCTION

عزیز لاهوجی^۱، منصوره میرابوالفتحی^{۱*} و روح الله کرمی اسبو^۲

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۵/۲۶؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۱۲/۵)

چکیده

اسانس‌ها علاوه بر خاصیت ضد میکروبی دارای خواص ضد تولید توکسین نیز می‌باشند. گیاه آویشن شیرازی با نام علمی *Zataria multiflora* در ایران انتشار نسبتاً وسیعی دارد. گیاه مرزه نیز با نام علمی *Satureja hortensis* نیز گیاهی است علفی که در اکثر مناطق ایران می‌روید، تیمول و کارواکرول نیز از اجزای اصلی اسانس‌های گیاهان فوق هستند. اثر اسانس‌های آویشن شیرازی و مرزه، و مواد تیمول و کارواکرول بر رشد ده جدایه *Fusarium graminearum* به روش اختلاط غلظت‌های مختلف آنها با محیط‌های کشت PDA و PDB و اندازه‌گیری میزان رشد هیف تیمارها در محیط نیمه جامد و وزن خشک توده میسلیمی در محیط مایع و مقایسه آنها با شاهد آزمایش محاسبه گردید. اثر مواد نام برده بر میزان داکسی نیوالنول تولید شده توسط جدایه‌های مذکور، با اندازه‌گیری میزان داکسی نیوالنول تولید شده در محیط PDB حاوی غلظت‌های مختلف مواد فوق و مقایسه آنها با شاهد عاری از مواد فوق با روش HPLC IAC + محاسبه شد. نتایج این بررسی نشان داد که اسانس‌ها و مواد مذکور دارای فعالیت قارچ‌ایستایی و بازدارندگی از تولید داکسی نیوالنول هستند. غلظت لازم برای بازداری کامل از رشد جدایه‌های مورد استفاده در یکصد میلی‌لیتر محیط کشت PDA به ترتیب برای اسانس‌های آویشن شیرازی و مرزه برابر ۱۶ و ۳۱/۵ میکرولیتر و برای مواد تیمول و کارواکرول ۷۰ و ۱۵ میکرولیتر برآورد گردید. غلظت مذکور در محیط مایع PDB برای آویشن شیرازی و مرزه به ترتیب ۱۶ و ۳۰ و برای تیمول و کارواکرول به ترتیب ۷۰ و ۲۰ میکرولیتر بود. بیشترین و کمترین کاهش وزن خشک میسلیم در محیط کشت مایع حاوی اسانس‌ها و مواد مؤثره فوق الذکر به ترتیب مربوط به جدایه‌های شماره ۶ و ۵۰ بود. میزان داکسی نیوالنول تولید شده در محیط مایع حاوی تیمارهای آویشن شیرازی، مرزه، تیمول و کارواکرول به ترتیب ۸۴، ۸۹/۱، ۹۵ و ۸۶/۶ درصد نسبت به شاهد بدون اسانس کاهش یافت. هم‌چنین در هر میلی‌گرم ماده خشک میسلیم در شاهد و تیمارهای تیمول، کارواکرول، آویشن و مرزه به ترتیب ۳۵۳/۹، ۱۷/۹، ۲۷/۵، ۹۲/۶ و ۹۴/۲ نانوگرم داکسی نیوالنول ردیابی گردید، که این نتایج گویای تأثیر مستقیم اسانس‌ها و مواد مؤثر مورد مصرف بر ساختار داکسی نیوالنول بود. علاوه بر این، مواد مذکور به سبب دارا بودن ویژگی قارچ‌ایستایی با بازداری از رشد قارچ به طور غیر مستقیم نیز بر کاهش تولید داکسی نیوالنول مؤثر بودند.

واژه‌های کلیدی: اسانس، آویشن شیرازی، مرزه، تیمول، کارواکرول، داکسی نیوالنول، *Fusarium graminearum*

*: بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان

** :مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mmirab2000@yahoo.com

۱. استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان

۲. عضو هیئت علمی آزمایشگاه تحقیقات مایکوتوکسین‌ها، مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور

مقدمه

خانواده نعناعیان هستند. این دو ترکیب از نظر شیمیایی بسیار به هم شبیه‌اند و فقط جایگاه گروه هیدروکسیل در آنها متفاوت است. تیمول و کارواکرول از اجزای ضد میکروبی بسیار مؤثر در اسانس‌ها هستند (Buchanan & Sheferd, 1981). اثر ضد میکروبی آنها به دلیل نفوذپذیر نمودن غشای سلول توسط آنهاست که می‌توانند با کاتیون‌های سطح غشا کلاته شده و فعالیت‌های حیاتی را مختل کنند (Ultee et al. 1999).

داکسی نیوالنول میکوتوکسینی از گروه تریکوتسین‌هاست. این میکوتوکسین متابولیت ثانویه قارچ *Fusarium graminearum* است که وجود آن در ذرت، گندم، جو، یولاف و برنج از آمریکا، کانادا و ژاپن گزارش شده است (Pestka et al. 1985). داکسی نیوالنول (DON) می‌تواند موجب نشت الکترولیت‌ها گردیده و این امر سبب تأمین بستر غذایی مناسب جهت گسترش عامل بیماری‌زا می‌گردد. هم‌چنین قارچ به صورت گندرو در بستر غذایی و درون میزبان گسترش می‌یابد (Desjardins et al. 1993).

مواد غذایی آلوده به داکسی نیوالنول در غلظت‌های پایین سبب بروز علائم متعددی شامل کم‌خونی، تهوع، خونریزی، کاهش ایمنی و کم‌اشتهایی در حیوانات (Persica et al. 1999) و اختلالات استروژنیک، سرطان مری و کاهش ایمنی در انسان می‌شوند (Lou et al. 1990).

در ترکیه اثر اسانس گیاه مرزه روی قارچ‌های *Alternaria mali* و *Botrytis cinerea* بررسی و نشان داده شده که غلظت‌های ۱، ۳ و ۵ میکرو لیتر در ۶۰ میلی لیتر آن پس از هفت روز به ترتیب سبب ممانعت از رشد ۵۰، ۷۵ و ۸۷ درصد قارچ *A.mali* و ۷۵ و ۸۷ درصد قارچ *B.cinerea* شده است (Ozcan & Boyraz, 2006). اثر

در سال‌های اخیر به دلیل افزایش علاقه مردم به مصرف مواد طبیعی و نیز شیوع بیماری‌های گوارشی، تنفسی و انواع سرطان‌ها، تحقیقات گسترده‌ای برای استفاده از اسانس‌ها انجام گرفته است. اسانس‌ها علاوه بر خاصیت ضد میکروبی دارای خواص ضد انگلی و ضد تولید توکسین نیز هستند که این ویژگی‌ها در ارتباط با نوع ماده مؤثره موجود در اسانس است (Burt, 2004). گیاه آویشن شیرازی با نام علمی *Zataria multiflora* گیاهی پایا با بوته‌هایی به ارتفاع ۸۰-۴۰ سانتی متر، سبز متمایل به سفید و معطر، با ساقه‌های متعدد، محکم و مقاوم، با پوست خاکستری متمایل به سفید یا کمی متمایل به قهوه‌ای است، برگ آویشن شیرازی کوچک و دارای دمبرگ کوتاه است. گیاه آویشن شیرازی انتشار نسبتاً وسیعی در ایران دارد و در بخش‌های مرکزی، جنوب و جنوب شرقی ایران، بخش مرکزی نجف آباد اصفهان، یزد، خور میز در پانزده کیلومتری مهریز، دزفول در خوزستان، فیروز آباد در فارس، خور موج نزدیک بوشهر، مناطق جنوب شرقی ایران بین کرمان و زرنند، علی آباد، حاجی آباد بندر عباس، گهر، ارتفاعات گنو، آب گرم گنو، تا بلوچستان دیده می‌شود (Zargari 1370).

گیاه مرزه با نام علمی *Satureja hortensis* گیاهی است علفی، یک ساله و دارای ساقه منشعب به طول ۱۰-۳۰ سانتی متر که به دلیل دارا بودن ظاهری به رنگ سبز خاک آلود متمایل به خاکستری، از گونه‌های مشابه قابل تشخیص می‌باشد. برگ‌های آن باریک و بلند است. در ایران گیاه مرزه در نواحی شمال غربی، تبریز، خوی، ارسباران و نواحی مختلف خراسان کشت می‌گردد (زرگری، ۱۳۷۰).

تیمول و کارواکرول از اجزای اصلی اسانس‌های

آن برای تمام قارچ‌ها برابر با ۱۲۵ ppm، بوده است (Rahimifard et al. 1998). اسانس گیاه آویشن شیرازی روی دو جدایه استاندارد *Salmonella typhimorium* مورد بررسی قرار گرفته و مشخص شده که غلظت‌های ۱، ۲/۵ و ۵ درصد آن به ترتیب باعث هاله عدم رشدی معادل ۰-۸، ۸/۶-۹/۳ و ۱۵/۶-۲۱/۶ میلی‌متر شده است (سفیادکن و همکاران، ۱۳۸۵). اسانس گیاه آویشن شیرازی در غلظت ۱۰ میکرولیتر در ۳۰ میلی‌لیتر روی جدایه *Escherichia coli* ATCC 25922 باعث ۴۲ میلی‌متر هاله عدم رشد شده است (مصحفی و همکاران، ۱۳۸۵).

اسانس‌های آویشن و مرزه و مواد کارواکروول و تیمول در غلظت ۰/۰۵ مولار در محیط کشت به ترتیب به میزان ۶، ۵ و ۷ میلی‌متر سبب هاله بازدارندگی از رشد باکتری *Erwinia amylovora* شده‌اند (Karami-Osboo et al., 2010).

اثر اسانس گیاه *Origanum syriacum* حاوی تیمول و کارواکروول بر قارچ‌های *Fusarium*، *Aspergillus niger* و *oxysporum* sp. و *Penicillium* نشان داده که کمترین غلظت بازدارندگی آن ۰/۱۱۱۱ در میلی‌لیتر بوده است (Daouk et al. 1995). در سوئیس اثر ماده مؤثره تیمول بر باکتری‌های *Porphyromonas gingivalis* OMZ و *Selenomonas artemidis* OMZ317,309 و *Streptococcus sobrinus* OMZ 176 نشان داده که کمترین غلظت بازدارندگی آنها به ترتیب برابر ۲/۲ و ۲/۷ میلی‌مولار بوده است و نیز مشخص گردیده که غلظت‌های ذکر شده در هر سه باکتری دارای خاصیت باکتری ایستایی بوده است نه باکتری کشی (Shapiro & Guggenheim, 1995).

کمترین غلظت بازدارندگی ماده مؤثره کارواکروول بر قارچ *Penicillium expansum* برابر ۲۴/۶ میکرولیتر در ۲۰

اسانس آویشن *Zataria multiflora* Boiss بر رشد، تولید اسپور و آفلاتوکسین جدایه ATCC15546 *Aspergillus flavus* در محیط کشت و پنیر سفید ایرانی در آب نمک بررسی شده است (Gandomi et al. 2009). غلظت بیشتر از ۴۰۰ ppm اسانس مذکور در محیط کشت PDA رشد قارچ را کاملاً بازدارندگی نموده است، غلظت ۲۰۰ ppm نیز میزان رشد شعاعی و تولید اسپور را به ترتیب ۷۹/۴ و ۹۲/۵ درصد کاهش داده است، کمینه غلظت قارچکشی اسانس ۱۰۰۰ ppm بوده است. رشد میسلیم و تولید آفلاتوکسین در همه غلظت‌های به کار گرفته شده اسانس در محیط مایع سرکوب شده است به طوری که غلظت ۱۵۰ ppm آن رشد میسلیم و تولید آفلاتوکسین را به ترتیب ۹۰ و ۹۹/۴ درصد کاهش داده است، همه غلظت‌های به کار برده شده اسانس رشد شعاعی قارچ و تولید آفلاتوکسین به وسیله *Aspergillus flavus* در پنیر را ممانعت نمود. اما هیچ غلظتی از آن در پنیر رشد قارچ و تولید آفلاتوکسین را کاملاً بازدارندگی ننمود. بررسی اثر اسانس گیاهان مرزه و آویشن بر *Aspergillus parasiticus* نشان داده که حداقل غلظت بازدارندگی با استفاده از آویشن ۱۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر و برای مرزه ۲۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر بوده است (مسکوکوی و مرتضوی، ۱۳۸۳). نتایج تحقیقات سرداری و همکاران گویای اثر ضد قارچی بالای عصاره‌های گیاهان *Diplotaenia damavandica*، *Heracleum persicum*، *Sanguisorba minor* و *Zataria multiflora* بر چندین گونه از قارچ‌های جنس *Aspergillus*، *Candida* و *Cryptococcus* می‌باشد (Sardari et al. 1998). اسانس گیاه *Zataria multiflora* سبب بازدارندگی چشمگیری در قارچ‌های *Aspergillus falvus*، *Candida albicans* و *Aspergillus niger* شده است و حداقل غلظت بازدارندگی

کاهش تولید داکسی نیوالنول بود.

مواد و روش

۱ - اسانس‌ها و مواد مؤثره مورد استفاده

اسانس‌های آویشن شیرازی و مرزه از شرکت باریج اسانس کاشان که با روش تقطیر با آب و در مقیاس صنعتی به دست آمده بودند، تهیه گردید. اسانس‌های به دست آمده در شیشه‌های تیره در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد درون یخچال تا زمان استفاده نگهداری شد. تیمول (Thymol) با خلوص ۹۹٪ و کارواکرول (Carvacrol) با خلوص ۹۷٪ از پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی تهیه گردید.

۲ - جدایه‌های قارچی

جدایه‌های قارچی مورد استفاده در این تحقیق شامل جدایه‌های استاندارد *F. graminearum* با کدهای F.g.N32، F.g.N24، F.g.N11، F.g.N7، F.g.N6، F.g.N56 و F.g.N50، F.g.N44، F.g.N43، F.g.N36 بودند که در مجموعه کشت‌های قارچی آزمایشگاه تحقیقات مایکو توکسین‌ها، مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور نگهداری می‌شوند.

۳- بررسی بازدارندگی از رشد

اثر بازدارندگی اسانس‌های آویشن شیرازی و مرزه و مواد مؤثره تیمول و کارواکرول بر رشد جدایه‌های شماره ۶، ۷، ۱۱، ۲۴، ۳۲، ۳۶، ۴۳، ۴۴، ۵۰ و ۵۶ قارچ *F. graminearum* به روش اختلاط با محیط‌های کشت (Potato Dextrose Agar) و PDA (Potato Dextrose) (PDB Broth) مورد ارزیابی قرار گرفت.

میلی‌لیتر بوده که در این غلظت کارواکرول خاصیت قارچ‌ایستایی داشته است و نه قارچ‌کشی (Neri et al. 2006). در فرانسه کمترین غلظت بازدارندگی کارواکرول بر *S. cerevisiae* و *B. subtilis* P. fluorescens به ترتیب ۱، ۲۵٪ و ۲۵٪ گرم بر لیتر بوده است که در غلظت‌های یاد شده کارواکرول خاصیت باکتری‌ایستایی داشته است نه باکتری‌کشی (Ben arfa et al. 2006). در آلبانی اثر مواد مؤثره تیمول و کارواکرول روی دو باکتری *Salmonella enterica* و *Escherichia coli* O157:H7 آزمایش شده است که کارواکرول در غلظت ۱۰۴ μl/ml به ترتیب ۷۰ و ۶۸ درصد بازدارندگی داشت و تیمول در غلظت ۲۹/۹ μl/ml به ترتیب سبب ۹۸ و ۶۷ درصد بازدارندگی داشت (Friedman et al. 2006).

در چین اثر مواد مؤثره تیمول و کارواکرول و مخلوط آن دو بر باکتری *Salmonella typhimorium* بررسی شده است. کمترین غلظت بازدارندگی برای کارواکرول یا تیمول ۴۰۰ μl/l و برای مخلوط این دو ۱۰۰ μl/l بوده است (Zhou et al 2007). در عمان اسانس گیاه *Plectranthus cylindraceus* که حاوی ۴۶/۸٪ کارواکرول است روی قارچ‌های *Alternaria Bipolaris* sp. *Curvularia lunata* *Fusarium oxysporum alternata* و *Stemphyllum solani* بررسی شده و نشان داده که غلظت ۱۲۵ میکرولیتر در ۱۴۹ میلی‌لیتر آن به ترتیب ۷۴/۱، ۷۰/۶، ۱۰۰، ۷۷/۷ و ۸۴/۶ درصد بازدارندگی و غلظت ۲۵۰ میکرولیتر در ۱۴۹ میلی‌لیتر آن سبب ۱۰۰٪ بازدارندگی تمامی قارچ‌های مورد استفاده شده است (Marwah et al. 2007).

هدف از این تحقیق بررسی اثر اسانس‌های آویشن شیرازی، مرزه و مواد مؤثره تیمول و کارواکرول بر رشد جدایه‌های مختلف قارچ *Fusarium graminearum* و

۳-۱- در محیط کشت PDA

اثر ضد قارچی اسانس‌های آویشن شیرازی و مرزه و مواد مؤثره تیمول و کارواکربول بر جدایه‌های مختلف قارچ *Fusarium graminearum* به روش اختلاط با محیط کشت (Grover & Moore 1962) بررسی شد. به این منظور ابتدا ۲۵ میکرو لیتر توئین بیست به ۵۰ میلی لیتر (۵٪ درصد) و از هر یک از اسانس‌ها افزوده شد. تیمول (۱۵٪ گرم) در حلال تولوئن (۵۰۰ میکرو لیتر) حل شد و ماده مؤثره کارواکربول به صورت خالص استفاده شد. هم‌چنین توئین بیست (۵٪ درصد) و حلال تولوئن هر یک به تنهایی به عنوان تیمارهای شاهد در آزمایش منظور شد. فلاسک‌های حاوی محیط کشت PDA پس از اتوکلاو شدن در دمای اتاق قرار داده شدند تا به دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد تنزل یابند. ابتدا جهت تعیین حداقل غلظت‌های مؤثر، اثر ضد قارچی غلظت‌های ۰، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرو لیتر اسانس‌های آویشن شیرازی و مرزه و مواد مؤثره تیمول و کارواکربول در ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت بر جدایه شماره ۶ *Fusarium graminearum* بررسی شد، سپس گستره‌ای از حداقل غلظت‌های مؤثر هر یک از ترکیبات به شرح: غلظت‌های ۱۴، ۱۴/۵، ۱۵، ۱۵/۵، ۱۶ میکرو لیتر از آویشن شیرازی، ۲۷/۵، ۳۰، ۳۰/۵، ۳۱/۵ میکرو لیتر از مرزه، ۴۰، ۴۵، ۵۰، ۵۵، ۶۰، ۶۵ و ۷۰ میکرو لیتر تیمول و ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ میکرو لیتر کارواکربول در ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت PDA انتخاب، به محیط اضافه و به آرامی به هم زده شد تا محیط یک‌نواختی تهیه گردد. محیط‌های حاصل بلافاصله درون ظروف پتری ۹ سانتی‌متری توزیع و در دمای آزمایشگاه منعقد شدند. سپس یک دیسک قارچی به قطر ۵ میلی‌متر از لبه کلنی ۷ روزه هریک از ده جدایه در محیط کشت PDA به کمک چوب پنبه سوراخ کن برداشته و در مرکز هر یک از

تشتک‌های پتری گذاشته شد، پتری‌های مایه‌زنی شده در انکوباتور ۲۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از گذشت ۵ روز قطر رشد هر جدایه اندازه‌گیری شد. در انجام این آزمایش برای هر تیمار ۴ تکرار در نظر گرفته و آزمایش‌ها دو بار تکرار گردید.

۳-۲- در محیط کشت PDB

چگونگی افزودن اسانس‌ها و مواد مؤثر به محیط PDB مشابه روش کاربرد آن در محیط PDA بود. فلاسک‌های ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط کشت PDB پس از اتوکلاو شدن در دمای اتاق قرار داده شدند تا سرد گردد. سپس به ترتیب مقادیر ۱۶، ۳۰، ۶۰ و ۲۰ میکرو لیتر در ۱۰۰ میلی لیتر از هر یک از اسانس‌های آویشن و مرزه و مواد مؤثره تیمول و کارواکربول به فلاسک‌های حاوی محیط کشت PDB اضافه و به آرامی تکان داده شد. سپس دیسک‌های قارچی به قطر ۵ میلی‌متر توسط چوب پنبه سوراخ کن از کشت‌های جوان جدایه‌های قارچ *F.graminearum* تهیه و ۳ دیسک قارچی به هر فلاسک محتوی محیط کشت PDB اضافه شد. فلاسک‌های مایه‌زنی شده در انکوباتور با دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از گذشت ۷ روز محتوی فلاسک‌ها با استفاده از پمپ خلا از کاغذ صافی واتمن ۱ عبور داده شد و وزن خشک میسلیم به جا مانده بر روی کاغذ صافی پس از خشک کردن آن به مدت ۲ ساعت در ۶۰ درجه سانتی‌گراد تعیین شد. در این آزمایش برای هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شد و آزمایش‌ها دو بار تکرار گردید.

۳-۳- تعیین حداقل غلظت بازدارندگی

میزان حداقل غلظت بازدارندگی عبارت بود از حداقل غلظتی از اسانس یا ماده مؤثره که در آن جدایه قارچی پس از طی دوره انکوباسیون هیچ‌گونه رشدی نداشت.

۳-۴- درصد بازدارندگی از رشد

درصد بازدارندگی غلظت‌های مختلف اسانس و مواد مؤثره با بهره‌گیری از فرمول ارائه شده توسط پنلیدی و همکاران (Pandey et al, 1982) انجام شد.

$$\% \text{GI} = (dc - dt / dc) \times 100$$

GI = Growth Inhibition باز دارندگی از رشد (میلی‌متر)

dc = diameter control میانگین قطر رشد قارچ در تیمار

شاهد (میلی‌متر)

dt = diameter treatment میانگین قطر رشد قارچ در

تیمار مورد بررسی (میلی‌متر)

۳-۵- تعیین خاصیت قارچ ایستایی یا قارچ کشی

اسانس و مواد مؤثره

برای تفکیک اثر قارچ ایستایی از قارچ کشی اسانس‌ها و مواد مؤثره از روش ارائه شده توسط تامسون (Thomson 1989) استفاده شد. بدین منظور قطعه محیط کشت حاوی قارچ که در تیمار اسانس و یا ماده مؤثره هیچ‌گونه رشدی نداشت به محیط کشت PDA عاری از اسانس و مواد مؤثره منتقل شد، در صورتی‌که قطعه مذکور پس از هفت تا ده روز در محیط فاقد مواد فوق‌الذکر رشد می‌کرد این امر به عنوان ویژه گی قارچ ایستایی ماده مذکور ارزیابی می‌گردید.

۴- تأثیر اسانس‌ها و مواد مؤثره بر تولید داکسی نیوالنول

اثر اسانس‌های آویشن و مرزه و مواد مؤثره تیمول و کارواکرون روی توکسین زایی جدایه شماره ۴۴ *F.graminearum* که توکسین زایی بالاتر آن در بین سایر جدایه‌ها قبلاً اثبات شده بود بررسی گردید و میزان بازدارندگی از تولید داکسی نیوالنول در تیمارهای مختلف با استفاده از نسبت میزان DON تولید شده در تیمارهای اسانس و مواد مؤثره به میزان DON تولید شده در شاهد فاقد اسانس یا ماده مؤثره و کاستن آن از عدد یک محاسبه شد.

۴-۱- استخراج داکسی نیوالنول از توده‌های قارچی

تیمار شاهد

بدین منظور ابتدا جدایه توکسین زا به روش بند ۳-۳ در محیط کشت مایع کشت شد و توده های قارچی استحصال شده در آن ۵۰ درجه سانتی‌گراد خشک و همراه ۱۵ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر درون هاون، در شرایط سترون به خوبی سائیده و به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه شیکر با ۱۰۰ تکان در دقیقه قرار داده شد. سپس با استفاده از کاغذ صافی واتمن ۱ و پمپ خلا فیلتر و عصاره آن استخراج گردید. نهایتاً ۲/۵ میلی‌لیتر از عصاره استخراج شده جهت مراحل بعدی اندازه‌گیری داکسی نیوالنول استفاده شد.

۴-۲- استخراج داکسی نیوالنول از توده‌های قارچی

تیمار اسانس‌ها و مواد مؤثره

بدین منظور هر یک از توده‌های قارچی که با اسانس‌ها یا مواد تیمول و کارواکرون تیمار شده بودند پس از خشک شدن در آن در داخل لوله‌های اپندورف (مینی تیوب) همراه ۱ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر سائیده شده و سپس به مدت ۷ دقیقه ورتکس و ۰/۷ میلی‌لیتر از هر یک از

منحنی کالیبراسیون استفاده شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از هر نمونه به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) از کارخانه Waters با پمپ Breeze، دکتور UV ۲۴۸۹، تزریق کننده خودکار ۷۱۷، ستون فاز معکوس C-18 کارخانه (Waters Milford, MA, USA) با ابعاد 150×3.9 mm و اندازه ذرات 4μm تزریق شد. فاز متحرک آب: استونیتریل (به نسبت ۹:۱ حجم به حجم) و سرعت جریان 1 ml/min بود. میزان داکسی نیوالنول در طول موج 218 nm، با استفاده از نرم افزار Breeze و محاسبه سطح زیر منحنی کروماتوگرام داکسی نیوالنول در مقایسه با منحنی کالیبراسیون مختص همان آزمایش محاسبه گردید. برای هر نمونه مدت زمان ۸ دقیقه در نظر گرفته شد.

۵- تجزیه و تحلیل داده‌ها

در این آزمایش از طرح کاملاً تصادفی و آزمایش فاکتوریل (فاکتور A غلظت اسانس‌ها و مواد مؤثره و فاکتور B جدایه‌های مورد بررسی) با طرح پایه کاملاً تصادفی برای بررسی آثار ساده و متقابل استفاده شد. جهت تجزیه واریانس و گروه‌بندی میانگین تیمارها از نرم افزار MSTATC و آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده گردید (علیزاده و تازی نژاد، ۱۳۸۰).

نتایج

نتایج بررسی های اولیه حاصل از تجزیه واریانس و مقایسه میانگین داده های اثر دامنه وسیع غلظت‌ها جهت انتخاب دامنه محدودتری از آنها نشان داد که غلظت‌های کمتر از ۲۵ و بیشتر از ۵۰ میکروگرم در یکصد میلی لیتر از اسانس‌های آویشن شیرازی، مرزه و مواد مؤثره تیمول و کارواکول سبب جلوگیری از رشد جدایه ۶ شده

عصاره‌های استخراج شده جهت مراحل بعدی اندازه‌گیری داکسی نیوالنول استفاده شد.

۴-۳- استخراج داکسی نیوالنول از بستر کشت شاهد و

تیمار اسانس‌ها و مواد مؤثره

به این منظور میزان ۱۵ میلی لیتر محیط کشت مایع بستر رشد جدایه شماره ۴۴ *F. graminearum* از تیمار شاهد و مقدار ۱۵ میلی لیتر محیط کشت مایع بستر رشد جدایه فوق‌الذکر که با اسانس‌های آویشن شیرازی و مرزه و مواد تیمول و کارواکول تیمار شده بود پس از عبور از کاغذ صافی جهت مراحل بعدی اندازه‌گیری داکسی نیوالنول استفاده شد.

۴-۴- تصفیه داکسی نیوالنول

میزان ۱۵ میلی لیتر از محیط مایع تیمار شاهد و محیط مایع تیمار اسانس‌ها و مواد مؤثره که با فیلتر واتمن ۱ صاف شده بود مجدداً با فیلتر (GF/A glass microfibre) صاف شد و از ستون‌های ایمنوآفینیتی داکسی نیوالنول (DONPREP) با سرعت ۱ قطره در هر ثانیه عبور داده شده و پس از شستشوی ستون با ۵ میلی لیتر آب دیونیزه، داکسی نیوالنول موجود در ستون با ۱/۵ میلی لیتر متانول از ستون شستشو و ویال‌های محتوی متانول در درون دستگاه تغلیظ کننده قرار داده شدند. پس از ۲/۵ ساعت، ویال‌ها کاملاً خشک شدند و سپس ۲ میلی لیتر حلال آب: استونیتریل (به نسبت ۹:۱ حجم به حجم) به هر یک از ویال‌ها اضافه، ورتکس و داکسی نیوالنول در آن حل شد.

۴-۵- اندازه‌گیری داکسی نیوالنول با دستگاه

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

بدین منظور ابتدا از استانداردهای ۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ نانوگرم در میلی لیتر داکسی نیوالنول برای رسم

و دارای فعالیت قارچ ایستایی بودند (جدول ۱).

در بررسی‌های ثانویه، اسانس آویشن شیرازی با غلظت $14\mu\text{l}/100\text{ml}$ - ۱۶ (جدول ۲) باعث کاهش رشد $87/50 - 100$ درصد در جدایه‌های مختلف *F. graminearum* گردید، غلظت $16\mu\text{l}/100\text{ml}$ آویشن شیرازی باعث بازداری کامل از رشد همه جدایه‌ها در محیط جامد شد.

هم‌چنین غلظت $16\mu\text{l}/100\text{ml}$ اسانس آویشن شیرازی باعث کاهش ۹۴-۹۸ درصدی وزن توده قارچی در محیط مایع شده است (جدول ۳).

اسانس مرزه با غلظت $27/5\mu\text{l}/100\text{ml}$ - $31/5$ باعث کاهش رشد $79/92 - 100$ درصد در جدایه‌های مختلف *F. graminearum* گردید. مرزه با غلظت $31/5\mu\text{l}/100\text{ml}$ سبب بازداری کامل رشد همه جدایه‌ها در محیط PDA شد (جدول ۴).

هم‌چنین غلظت $30\mu\text{l}/100\text{ml}$ اسانس مذکور باعث کاهش ۹۶-۹۸ درصدی وزن توده قارچی در محیط مایع گردید (جدول ۵).

ماده تیمول با غلظت $70\mu\text{l}/100\text{ml}$ - ۴۰ باعث کاهش رشد $80/6 - 100$ درصد در جدایه‌های مختلف *F. graminearum* تیمول با غلظت $70\mu\text{l}/100\text{ml}$ سبب بازداری کامل رشد همه جدایه‌ها در محیط PDA شد (جدول ۶).

هم‌چنین غلظت $70\mu\text{l}/100\text{ml}$ ماده تیمول باعث کاهش $96/6 - 98/3$ درصدی وزن توده قارچی در محیط مایع گردید (جدول ۷).

ماده کارواکرول با غلظت $15\mu\text{l}/100\text{ml}$ - ۵ باعث کاهش رشد $80 - 100$ درصد در جدایه‌های مختلف *F. graminearum* کارواکرول با غلظت $\mu\text{l}/100\text{ml}$ ۱۵ سبب بازداری کامل رشد همه جدایه‌ها در محیط PDA

شد (جدول ۸).

میزان تأثیر اسانس‌های آویشن شیرازی و مرزه و مواد تیمول و کارواکرول بر رشد جدایه‌های مختلف *F. graminearum* متفاوت بود، هم‌چنین حداقل غلظت لازم برای بازداری کامل از رشد جدایه‌های مختلف در محیط جامد نیز متفاوت بود (جدول ۹).

مجموع میزان داکسی نیوالنول تولید شده در توده میسلیمی و بستر کشت شاهد $862/4$ نانوگرم در میلی‌گرم و در تیمارهای آویشن شیرازی، مرزه، تیمول و کارواکرول به ترتیب با غلظت‌های ۱۶ و ۳۰ و ۷۰ و ۲۰ میکرولیتر در یکصد میلی‌لیتر $138/1$ ، $94/2$ ، $43/6$ و $116/1$ نانوگرم در میلی‌گرم بر آورد گردید. بنابراین به ترتیب ۸۴، $89/1$ ، ۹۵ و $86/6$ درصد کاهش میزان تولید داکسی نیوالنول را سبب شدند (جداول ۱۰ و ۱۱).

بحث

نتایج نشان می‌دهد که اسانس‌های آویشن شیرازی با غلظت $16\mu\text{l}/100\text{ml}$ ، مرزه با غلظت $31/5\mu\text{l}/100\text{ml}$ تیمول با غلظت $70\mu\text{l}/100\text{ml}$ و کارواکرول با غلظت $15\mu\text{l}/100\text{ml}$ سبب بازداری کامل از رشد تمامی جدایه‌های *F. graminearum* در محیط PDA شده‌اند. مسکوکوی و مرتضوی (۱۳۸۳) غلظت ۲۰۰ میکرولیتر در ۲۰ میلی‌لیتر از اسانس آویشن را بر *Aspergillus parasiticus* مؤثر دانسته‌اند. آنها هم‌چنین غلظت ۴۰۰ میکرولیتر در ۲۰ میلی‌لیتر از اسانس مرزه را بر کنترل کامل *Aspergillus parasiticus* مؤثر دانسته‌اند. از طرفی غلظت ۱۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر اسانس آویشن شیرازی به میزان ۱۵ میلی‌متر از رشد کلنی باکتری *E.coli* جلوگیری نموده

جدول ۱. اثر غلظت های مختلف اسانس ها و مواد مؤثره بر میزان رشد (mm) جدایه شماره ۶ قارچ *F. graminearum* در محیط PDA

Table 1. The effect of different concentrations of essential oils and their two main components on the growth rate of the No 6 isolate of *F. graminearum* in PDA medium.

Mean of inhibition growth میانگین بازداری از رشد %±SE	Carvacrol کارواکرول (mm) growth	Thymol تیمول (mm) growth	<i>Satureja hortensis</i> مرزه (mm) growth	<i>Zataria multiflora</i> آویشن شیرازی (mm) growth	Concentration غلظت (µl/100ml)
0±0	40	40	45	45*	0
78±16.4	1	12	17	8	10
87.8±4.7	0	6	5	0	25
97.5±4.3	0	1	0	0	50
100	0	0	0	0	100

میلی متر میزان رشد جدایه شماره ۶ *F. graminearum* در تیمارهای مختلف اسانس ها، مواد مؤثر و شاهد فاقد آنها n=4

جدول ۲. بازداری رشد (%) جدایه های مختلف *F. graminearum* در اثر غلظت های مختلف آویشن شیرازی در محیط PDA

Table 2. Inhibition growth rate (%) of *F. graminearum* isolates affected by *Zataria multiflora* essential oil concentrations in PDA medium.

										شماره جدایه Isolate No Concentration غلظت (µ l/100ml)
56	50	44	43	36	32	24	11	7	6	14
90±6.9	87.5±8.6	92.2±5.1	92.8±4.7	90±6.9	95±3.4	90±9.6	93.1±5.1	92.8±4.7	95.6±3.4	14
i	j	gh	fg	i	de	i	f	fg	cd	
92.5±5.1	90±6.9	94.8±3.4	94.8±	92.5±5.1	97.5±1.7	92.5±4.7	95.4±3.4	94.8±3.4	100	14.5
fg	i	de	de	fg	b	fg	cd	de	a	
95±3.4	92.5±5.1	97.4±1.7	97.4±1.7	95±3.4	100	95±3.4	97.7±1.7	97.4±1.7	100	15
de	fg	b	b	de	a	de	b	b	a	
97.5±1.7	95±3.4	100	100	97.5±	100	97.5±1.7	100	100	100	15.5
b	de	a	a	b	a	b	a	a	a	
100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	16
a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	

* حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف معنی داری در سطح آماری ۵ درصد می باشد (Mean±SE) n=4

باعث بازداری از رشد باکتری *Salmonella typhiporium* شده است (Si et al. 2006). غلظت ۲۹/۹ میکرولیتر در ۵۰ میلی لیتر از تیمول باعث بازداری از رشد *Salmonella enterica* به میزان ۶۷٪ گردیده است (Friedman et al. 2006). این ماده در غلظت ۲۴/۵ میکرولیتر در ۲۰ میلی لیتر به میزان ۱۰۰٪ باعث جلوگیری از

است (مصطفی و همکاران، ۱۳۸۵). اوزجان و بویراز در سال ۲۰۰۶ در ترکیه نشان دادند که غلظت ۵ میکرولیتر در ۶۰ میلی لیتر از اسانس مرزه به میزان ۸۷٪ باعث کنترل *Botrytis* و *Alternaria mali* و *cinerea* شده است. غلظت ۲۰۰ میکرولیتر در لیتر از تیمول به میزان ۹۸/۱٪

جدول ۳. درصد بازداری رشد جدایه‌های مختلف *F. graminearum* در غلظت ۱۶ $\mu\text{l}/100\text{ml}$ اسانس آویشن شیرازی در محیط PDB
 Table 3. The inhibition growth rate of *F. graminearum* isolates (%) affected by *Zataria multiflora* essential oil (16 $\mu\text{l}/100\text{ml}$) in PDB medium.

شماره جدایه Isolate No	6	7	11	24	32	36	43	44	50	56
\pm میانگین Mean \pm SE	0.04 \pm 97.9	0.05 \pm 97.3	0.03 \pm 97.1	0.02 \pm 96.8	0.02 \pm 96.7	0.02 \pm 96.5	0.03 \pm 96.1	0.03 \pm 96.5	0.03 \pm 96.8	0.03 \pm 96.4
درصد بازداری Inhibition(%)										
گروه Groupe	a	b	b	c	c	c	d	d	c	d

*: حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف معنی داری در سطح آماری ۵ درصد می باشد (n=3).

جدول ۴. درصد بازداری رشد جدایه‌های مختلف *F. graminearum* در غلظت‌های مختلف اسانس مرزه در محیط PDA
 Table 4. The inhibition growth rate of *F. graminearum* isolates (%) affected by *Satureja hortensis* essential oil concentrations in PDA medium.

شماره جدایه Isolate No	6	7	11	24	32	36	43	44	50	56
غلظت Concentration $\mu\text{l}/100\text{ml}$										
27.5	97.7 \pm 1.7	79.9 \pm 11.6	86.6 \pm 8.6	84.6 \pm 8.6	88.1 \pm 8.2	86.1 \pm 8.6	83.7 \pm 10.8	83.3 \pm 8.6	81.3 \pm 12.1	83.2 \pm 9
	b	n	jk	lm	j	kl	m	m	n	m
30	100	91.1 \pm 5.1	97.5 \pm 1.7	93.8 \pm 3.4	95.6 \pm 3	94.4 \pm 3.4	92.2 \pm 5.1	90 \pm 5.1	89.9 \pm 6.4	91.2 \pm 4.7
	a	hi	b	e	cd	de	efgh	i	i	hi
30.5	100	94 \pm 3.4	100	96.9 \pm 1.7	97.5 \pm 1.7	97.2 \pm 1.7	100	93.2 \pm 3.4	92 \pm 5.1	93.6 \pm 3.4
	a	e	a	bc	b	bc	a	efg	gh	ef
31	100	97 \pm 1.7	100	100	100	100	100	96.6 \pm 1.7	97.3 \pm 1.7	96.8 \pm 1.7
	a	bc	a	a	a	a	a	bc	b	bc
31.5	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a

*: حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف معنی داری در سطح آماری ۵ درصد می باشد (Mean \pm SE)n=4

آویشن شیرازی به سبب دارا بودن هر دو ماده مؤثر تیمول و کارواکرول بهتر از اسانس مرزه که فقط کارواکرول دارد عمل نموده است. مقایسه مواد مؤثره کارواکرول و تیمول نشان می‌دهد که کارواکرول به مراتب بهتر از تیمول عمل نموده است. با توجه به منابع، هر دوی این مواد جزء ترکیبات فنلی، دارای ساختمان شیمیایی یکسان و از عوامل

رشد قارچ *Penicillium expansum* شده است (Neri et al. 2006). فریدمان و همکاران در سال ۲۰۰۶ دریافتند که ماده مزبور در غلظت ۱۰۴ میکرولیتر در ۵۰ میلی‌لیتر به میزان ۷۰٪ سبب کاهش رشد کلنی باکتری *E.coli* شده است. با توجه به نتایج به دست آمده در مورد اسانس‌ها در مطالعه حاضر می‌توان نتیجه گرفت که اسانس

جدول ۵. بازداری رشد (%) جدایه های مختلف *F. graminearum* در غلظت ۳۰ μl/100ml اسانس مرزه در محیط PDB.

Table 5. The inhibition growth rate of *F. graminearum* isolates (%) affected by *Satureja hortensis* essential oil (30μl/100ml) in PDB medium.

جدایه قارچ Isolate No	6	7	11	24	32	36	43	44	50	56
میانگین ± SE	±0.2	97.5±.01	±97.7	97.4±.02	97.3±.02	97.1±.02	96.6±.01	96.2±.02	96.8±.02	96.9±.02
Mean±SE	98.1	.01	.02	.03			.01			
گروه	a	b	b	b	b	c	d	d	d	d
Groupe										

*: حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف معنی داری در سطح آماری ۵ درصد می باشد n=3

جدول ۶. درصد بازداری رشد جدایه های مختلف *F. graminearum* در غلظت های مختلف تیمول در محیط PDA.

Table 6. The inhibition growth rate of *F. graminearum* isolates (%) affected by the Thymol concentrations in PDA medium.

شماره جدایه Isolate No	6	7	11	24	32	36	43	44	50	56
غلظت Concentration μl/100ml										
40	93.1±4.7	85±7.7	82.4±12.5	87.5±8.6	81.8±7.7	88±9	88.3±7.27	84.1±8.2	80.6±13.8	82.8±10.8
	f	m	p	k	q	j	j	n	r	p
45	94.4±3.8	86.6±6.9	86.1±9	90±5.1	91.4±5.6	91.3±5.6	91.6±5.6	86.6±6.9	83.1±11.6	86.2±8.6
	e	l	l	i	h	h	h	l	o	l
50	96.3±2.5	90±5.1	87.8±8.6	92.5±5.1	93.1±3.4	93.1±5.1	94.2±3.8	90.8±4.7	85.6±9	88.3±9.9
	c	i	k	g	f	f	e	h	m	j
55	97.7±1.7	93.3±3.4	90.3±6.9	95±3.4	96±2.5	95.6±3.4	96.8±2.5	93.3±3.4	87.5±8.2	91±5.5
	b	f	i	d	c	d	c	f	k	h
60	100	96.6±1.7	95.1±3.4	100	97.7±1.7	97.7±1.7	97.4±1.7	96.6±1.7	93.1±4.7	94.8±3.4
	a	c	de	a	b	b	b	e	f	e
65	100	100	100	100	100	100	100	100	96.9±2.1	97.2±1.7
	a	a	a	a	a	a	a	a	bc	b
70	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a

*: حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف معنی داری در سطح آماری ۵ درصد (Mean±SE) n=4

جدول ۷. بازداری از رشد (%) جدایه‌های مختلف *F. graminearum* در غلظت ۷۰ μl/100ml تیمول در محیط PDB

Table 7. The inhibition growth rate of *F. graminearum* isolates (%) affected by Thymol (70 μl/100ml) in PDB medium

شماره جدایه Isolate No	56	50	44	43	36	32	24	11	7	6
Mean±SE	96.8±.01	96.6±.02	97.1±.03	97.2±.03	97.6±.03	97.2±.03	97.5±.03	97.6±.01	97.7±.01	98.3±.02
گروه Groupe	d	d	c	c	c	c	b	b	b	a

*: حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف معنی داری در سطح آماری ۵ درصد می باشد n=3

جدول ۸. بازداری رشد (%) جدایه‌های مختلف کارواکرول در محیط PDA

Table 8. The inhibition growth rate of *F. graminearum* isolates (%) affected by the Carvacrol concentrations in PDA medium.

شماره جدایه Isolate No	56	50	44	43	36	32	24	11	7	6
غلظت Concentration μl/100ml	±17.3	84.6±8.6	80±13.8	88.5±6.9	82.5±12.1	85.7±8.6	89.3±6.9	80.6±13.4	90±6.9	93.5±5.1
5	m	j	l	i	k	j	i	l	h	e
10	h	h	h	b	f	g	±3.4 94.6 d	f	d	b
15	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
20	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
25	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a

*: حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف معنی داری در سطح آماری ۵ درصد می باشد. (Mean±SE) n=4

و مواد مؤثره تیمول و کارواکرول بر باکتری *Erwinia amylovora* به این نتیجه رسید که تیمول قوی‌تر عمل می‌نماید (Karami- Osboo et al 2010). در مورد کاهش داکسی نیوالنول، به ترتیب تیمول، اسانس مرزه، کارواکرول و اسانس آویشن شیرازی بیشترین کاهش تولید داکسی نیوالنول را سبب شده‌اند.

قوی ضد میکروبی هستند (Buchanan & Sheferd 1981). در تحقیق حاضر کارواکرول به صورت خالص استفاده شد ولی تیمول به علت ساختار بلوری و عدم حلالیت در تولوئن حل شد. در مقایسه اسانس ها و مواد مؤثره، ماده مؤثره کارواکرول بهتر از دو اسانس آویشن شیرازی و مرزه عمل کرده است. کرمی اسبو در بررسی اثر اسانس آویشن

صورت می‌توان امیدوار بود به جای استفاده از ترکیبات سنتتیک که همگی دارای اثرات سوء برای مصرف‌کنندگان هستند و ضمن تخریب محیط زیست، سلامت استفاده‌کنندگان را به خطر می‌اندازند از اسانس‌های طبیعی که خوشبختانه زمینه مواد اولیه و تولید آنها در کشور قابلیت‌های بسیار بالایی دارد استفاده نمود. از نظر صرفه اقتصادی هر چند اسانس‌ها در رقابت با قارچ‌کش‌های شیمیایی قیمت تمام شده گران‌تری دارند اما غلظت اسانس‌های مورد استفاده بسیار ناچیز بوده و مصرف آنها را توجیه می‌سازد. از طرف دیگر چون داکسی نیوالنول در گندم که غذای اصلی مردم است تولید می‌شود و این اسانس‌ها هم معطر هستند و ذائقه مردم ایران آنها را پذیرفته و به طور معمول از آنها استفاده می‌شود می‌توان آنها را در طبخ انواع نان و خمیرها استفاده نمود. البته ضروری است در تحقیقات آتی امکان تبدیل داکسی نیوالنول به مشتقات آن نیز بررسی شود.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (11-13) متن انگلیسی مراجعه شود.

نیوالنول تحت اثر اسانس‌ها و مواد موثره به سبب کاهش میزان رشد قارچ و احتمالاً شکسته شدن ساختار فرمول داکسی نیوالنول می‌باشد. چنان‌که در جدول ۱۰ ملاحظه می‌شود میزان داکسی نیوالنول در هر میلی‌گرم ماده خشک میسلیم در شاهد و تیمارهای تیمول، کارواکرو، آویشن و مرزه به ترتیب ۳۵۳/۹، ۱۷/۹، ۲۷/۵، ۹۲/۶ و ۹۴/۲ نانوگرم بود. این امر احتمالاً گویای تأثیر مستقیم اسانس‌ها و مواد مؤثر آنها بر ساختار داکسی نیوالنول می‌باشد. علاوه بر این، مواد مذکور به سبب دارا بودن ویژه‌گی قارچ‌ایستایی با بازداری از رشد قارچ به طور غیر مستقیم نیز بر کاهش تولید داکسی نیوالنول مؤثر بودند.

محمود در سال ۱۹۹۴ در بررسی اثر بعضی از اسانس‌های حاوی ترکیبات فنلی بر *Aspergillus flavus* به این نتیجه رسید که کاهش تولید آفلاتوکسین به دلیل کاهش توده میسلیمی قارچ می‌باشد.

ترکیبات فنلی دارای خاصیت بالای ضد میکروبی هستند و در واقع ترکیبات فنلی موجود در اسانس‌های گیاهی بیشترین تأثیر را در ایجاد خاصیت ضد میکروبی دارند. این ترکیبات هم در غشای سلول نفوذ می‌کنند و هم می‌توانند در لخته شدن محتویات سلول نقش داشته باشند (Burl & Coote 1999; Dorman & Dean 2000). در این