بررسی مکانیسم مولکولی کاهش بیوسنتز آفلاتوکسین B1 تحت‌تأثیر 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، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

[ب] گروه داروسازی سنتی، دانشکدهٔ 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 زمینهٔ کشاورزی و پزشکی می‌باشد و به‌علت خصوصیات کارسینوژنیک، موتاژنیک، تراتوژنیک، 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 محدودکردن 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 (*aflM*، *aflP* و *aflR*) موجود در خوشهٔ ژنی تولید AFB1 موردمطالعه 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 اضافه‌شدن ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصارهٔ گلپر در محیط کشت قارچ *Aspergillus flavus* تقریباً به مهار کامل بیان ژن‌های *aflM*، *aflP* منجر می‌شود. در حضور عصاره‌های موردمطالعه، سطح بیان ژن‌های *aflM*، *aflP* و *aflR* موجود در خوشهٔ ژنی بیوسنتز AFB1 کاهش یافت و در برخی غلظت‌ها متوقف شد.

نتیجه‌گیری: براساس مطالعهٔ حاضر نشان داده شد که مهار بیوسنتز آفلاتوکسین به‌دلیل کاهش سطح بیان ژن‌های موجود در خوشهٔ ژنی بیوسنتز آفلاتوکسین در اثر غلظت‌های ذکرشده عصاره‌های گلپر و اسپند اتفاق می‌افتد. در میان ژن‌های موردمطالعه 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.

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

تاریخ دریافت: مهر ۱۳۹۸

تاریخ پذیرش: خرداد ۱۴۰۰

مقدمه:

در میان سموم قارچی (مایکوتوکسین)، آفلاتوکسین‌ها تهدید جدی برای سلامتی انسان، دام و همچنین تجارت بین‌المللی محسوب می‌شوند. آفلاتوکسین‌ها درواقع متابولیت‌های ثانویهٔ قارچی و دارای خصوصیات سمی، سرطان‌زا، موتاژنیک و عوامل محرک سیستم ایمنی می‌باشند و اغلب توسط دو گونهٔ قارچی *Aspergillus flavus* و *Aspergillus parasiticus* در طیف وسیعی از محصولات غذایی تولید می‌گردند. آفلاتوکسین B1 (AFB1) به‌عنوان سمی‌ترین و سرطان‌زاترین سموم قارچی طبقه‌بندی می‌شود (۱، ۲، ۳).

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

* فرد مسئول مکاتبات: nassim.safari@gmail.com

www.SID.ir

شکمی، بی‌حالی، استفراغ، ادم و از دست‌دادن کشندهٔ 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 کلیهٔ مراحل تولید، امری ضروری و مهم برای تمامی کشورها محسوب می‌شود و درنهایت باعث اطمینان مصرف‌کنندگان از سلامت و کیفیت محصول و ارتقا صادرات می‌گردد. علی‌رغم تحقیقات انجام‌شده، کنترل قارچ‌های توکسین‌زا هنوز هم به‌عنوان یک مسئلهٔ 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 زنجیرهٔ 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 آسپرژیلوس، 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 ثانویهٔ بسیاری با ساختارهای مختلف تولید می‌کنند که در کنترل قارچ‌های بیماری‌زا مانند گونه‌های آسپرژیلوس بسیار مؤثر بوده‌اند (۱۰، ۱۱). استفاده از گیاه و ترکیبات گیاهی مانند اسانس، عصاره‌های گیاهی و مشتقات خالص‌شدهٔ گیاهی برای کنترل پاتوژن‌های گیاهی به‌دلیل 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 آسپرژیلوس تحت‌تأثیر عوامل مختلف محیطی نظیر دما، رطوبت و نور قرار دارد. مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین B1 یکی از مسیرهای ژنی شناسایی‌شده متابولیت‌های ثانویهٔ قارچی است (۱۵). در قارچ *A. flavus*، ژن‌هایی که به‌طور مستقیم در بیوسنتز آفلاتوکسین دخیل هستند در خوشهٔ ژنومی حدود ۸۰ کیلوبایتی قرار دارند که حاوی ۲۷ ژن و حدود ۲۱ واکنش آنزیمی هستند (۱۰، ۱۶، ۱۷). علاوه بر ژن‌های موجود در خوشهٔ ژنی آفلاتوکسین، پژوهش‌ها نشان داده است که ژن‌های تنظیم‌کنندهٔ خارجی مثل LaeA و VeA در تولید آفلاتوکسین نقش دارند (۱۸، ۱۹، ۲۰).

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

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

www.SID.ir

ایران پیشینه‌ای طولانی در زمینهٔ 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 ضدعفونی‌کننده، ضددرد، ضدسوءهاضمه و ضدنفخ استفاده می‌شود. در کتاب‌های طب سنتی بیان شده که مصرف بیش از اندازهٔ گیاه گلپر باعث سقط جنین می‌شود. مطالعات فارماکولوژیک نشان می‌دهد این گیاه خواص ضدمیکروبی، ضدالتهابی، ضدنفخ، ضدتشنج و شیرآور دارد (۲۳). گلپر دارای اثرات ضدمیکروبی زیادی است. از دود حاصل از سوختن دانهٔ خشک‌شدهٔ گلپر به همراه اسپند برای ضدعفونی‌کردن محیط استفاده می‌شود (۲۴). مطالعهٔ رزاقی ابیانه و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان داد که عصارهٔ میوهٔ 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 ضدعفونی هوای محیط اشاره شده است (۲۵). در طب عامهٔ مردم کندر را با اسپند می‌سوزاندند و به‌عنوان خوشبوکننده و تمیزکنندهٔ هوا به کار می‌بردند. درواقع اسپند به‌عنوان ضدعفونی‌کننده مصرف می‌شد (۲۶). برای گیاه دارویی اسپند در منابع طب سنتی خواص ضددرد، ضدنفخ، ضدانعقاد خون و ضدمیکروبی ذکر شده است. همچنین از دود آن برای درمان درد دندان و دورکردن پشه استفاده می‌شد (۲۵، ۲۹). در قدیم از عصارهٔ دانهٔ اسپند برای دورکردن پشه استفاده می‌شده است (۲۶، ۲۷، ۲۸). گیاه اسپند دربردارندهٔ مواد ضدمیکروبی از نوع فلاونوئیدها و آلکالوئیدها است که این مواد در بخش‌های مختلف به‌خصوص 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. دانهٔ 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 ضدمیکروبی، ضدتومور و مهارکنندهٔ فعالیت مونوآمینواکسیدازی برای اسپند ذکر شده است که اغلب به وجود ترکیبات آلکالوییدی در آن نسبت داده می‌شود (۳۱، ۳۲، ۳۳). همچنین در مطالعات دیگر اثر عصارهٔ 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 فلاحت* و *قانون* به بررسی گیاهانی پرداخته شد که دارای اثرات ضدمیکروبی قابل‌توجهی باشند و دو گیاه دارویی گلپر و اسپند براساس خصوصیات ذکرشده انتخاب شدند (۲۵، ۲۶، ۳۵) و مکانیسم مولکولی نحوهٔ عملکرد آن‌ها بر مسیر بیوسنتز AFB1 با بررسی بیان دو ژن کلیدی خوشهٔ ژنی تولید آفلاتوکسین (aflM و aflP) و یک ژن تنظیمی aflR، توسط Real-time PCR ارزیابی شد. هدف از این مطالعه، بررسی مهار بیوسنتز AFB1 با استفاده از گیاهان دارویی انتخاب‌شده 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 مورداستفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها:

سویهٔ قارچی و شرایط کشت با توجه به اثرات اثبات‌شدهٔ درمانی ترکیبات این دو گیاه در مطالعات جدید و اثبات تأثیرات ضدمیکروبی این ترکیبات در کنترل آفلاتوکسین باعث شکل‌گیری این فرضیه می‌شود که همراه‌سازی این ترکیبات با

www.SID.ir

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

سویهٔ قارچی *A. flavus* NRRL 3357 از کلکسیون میکروب بخش بیماری‌شناسی گیاهی دانشگاه ساپینزا ایتالیا تهیه شد. کلیهٔ 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 درجهٔ 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 ۱×۱۰۳ کنیدی در میلی‌لیتر توسط لام هموسیتومتر محاسبه شد (۱).

گیاهان دارویی، آماده‌سازی عصاره‌های گیاهی و تعیین حداقل غلظت بازدارندگی

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

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 شمارهٔ ۱، عصاره‌ها با استفاده از اواپراتور تغلیظ سپس توسط دستگاه فریزدرایر خشک شدند. در ابتدا ۵ غلظت از عصاره‌ها جهت تعیین حداقل غلظت بازدارنده تست شد سپس ۳ غلظت برای هر عصاره جهت انجام آزمایش‌ها انتخاب گردید. برای تهیهٔ رقت‌های مختلف هر عصاره از آب و اتانول مطابق با نسبت‌های استخراج استفاده شد. از حداکثر غلظت استفاده‌شده از اتانول در تهیهٔ 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 عصارهٔ مخمر و ساکارز (YES) برای آزمایش تولید آفلاتوکسین در این مطالعه استفاده شد.

جدول۱. کد هرباریومی و درصد حلال‌های مورداستفاده جهت عصاره‌گیری

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

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

www.SID.ir

جدول۲. محیط کشت‌ها جهت رشد قارچ A. flavus تولید آفلاتوکسین و ترکیبات آن‌ها

محیط کشت	ترکیبات تشکیل‌دهنده
Potato Dextrose Broth (PDB)	(20 g Dextrose and 4 g Potato starch) for 1 L of media
Sabouraud Dextrose Broth (SDB)	(40 g Dextrose (Glucose) and 10 g Peptone) for 1 L of media
Czapek Yeast Extract (CYE)	(30 g Sucrose, 5 g Yeast extract, Czapek concentrate 10 ml and 1 g K2HPO4) for 1 L of media
Malt Extract Broth (MEB)	(17 g Malt Extract, 3 g Peptone) for 1 L of media
Yeast Extract Peptone Dextrose (YEPD)	(10 g Yeast Extract, 20 g Dextrose, 20 g Peptone) for 1 L of media
Yeast Extract Sucrose (YES)	(20 g Yeast Extract, 20 g Sucrose, 1 g Potassium dihydrogen Phosphate and 0.5 g Magnesium sulphate) for 1 L of media

مهار 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 عصارهٔ گلپر (۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و برای عصارهٔ اسپند (۲، ۴ و ۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) بودند. برای بررسی میزان مهار رشد قارچ، در فالکون‌های 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 فالکون 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. فالکون‌ها به مدت ۷ روز در دمای ۲۸ درجهٔ سانتی‌گراد در تاریکی انکوبه شدند و پس از گذشت دورهٔ انکوباسیون، میسیلیوم‌های قارچی توسط کاغذ فیلتر واتمن شمارهٔ 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 نمونهٔ کنترل (نمونهٔ تیمارنشده با عصاره) را نشان می‌دهد و B وزن خشک نمونهٔ تیمارشده 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 فالکون 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 فاصلهٔ 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 درجهٔ 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.

تجزیه‌وتحلیل 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، اندازهٔ ذرات ۱/۸ میکرومتر، در دمای ۲۵ درجهٔ 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.

www.SID.ir

استخراج RNA و واکنش زنجیرۀ پلیمراز نسخه‌برداری معکوس (RT-PCR)

برای آنالیزهای بیان ژن، میسیلیوم‌های قارچ ابتدا در بافر سرد Phosphate-Buffered Saline (PBS) شست‌وشو و سپس توسط دستگاه فریزدرایر خشک شد. استخراج RNA از میسیلیوم قارچی با استفاده از TRIZOL® (سیگما- آلدریچ، ایالات متحدۀ آمریکا) و طبق دستورالعمل سازنده انجام شد. سپس تیمار با آنزیم DNase I به‌منظور حذف DNAژنـومی 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 RNA های استخراج در حضور آغازگرهای تصادفی و با استفاده از کیت SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit و مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده (Bioline) انجام گردید.

تجزیه‌وتحلیل 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). به‌منظور تعیین میزان بیان ژن‌های موردبررسی در مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین، از واکنش‌های کمّی Real Time PCR مبتنی بر رنگ فلورسنس SYBR Green توسط دستگاه LineGene 9620 کمپانی Bioer استفاده شد. ژن β-tubulin به‌عنوان مرجع مورداستفاده 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 به‌صورت زیر بود: ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجۀ سانتی‌گراد و سپس ۴۰ چرخه شامل ۹۵ درجۀ سانتی‌گراد برای ۱۵ ثانیه و سپس ۶۰ درجۀ سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و در انتها ۹۵ درجۀ سانتی‌گراد برای ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجۀ سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه و ۹۵ درجۀ سانتی‌گراد برای ۱۵ ثانیه (جدول ۴). در این مطالعه، تغییرات بیان ژن‌ها در سه تکرار دستگاهی و سه تکرار زیستی و با استفاده از روش۲-ΔΔCT محاسبه و سپس به‌صورت درصد ارزیابی شد.

جدول۳. ژن‌های کلیدی موجود در خوشۀ ژنی آفلاتوکسین و پرایمرهای طراحی‌شده برای آن‌ها

Gene	Primer pairs	Primer sequence (5′-3′)	Annealing temperature (°C)	PCR Product size (bp)
aflR	F	CACCCCCTTGCGATTAGTGT	60.04	167
	R	GTTGATCGATCGGCCAGTCT	59.90	
aflM	F	CACCGTCTCCGCCATTAACT	60.04	137
	R	TGGTGAACTACGCCCATTCC	60.11	
aflP	F	CAGAGCGTCCGAATCCCTTT	57.30	141
	R	GGTAGACCTCTCCTTCCCGT	57.17	
tubulin beta	F	GGAAGTCAGAAGCAGCCATC	59.89	211
	R	GTGACCACCTGTCTCCGTTT	58.62	

www.SID.ir

جدول۴. 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
aflR	95	10 min	95	15 s	58	30 s	72	2 min	72	5 min
aflM	95	10 min	95	15 s	60	30 s	72	2 min	72	5 min
aflP	95	10 min	95	15 s	57	30 s	72	2 min	72	5 min
tubulin beta	95	10 min	95	15 s	60	30 s	72	2 min	72	5 min

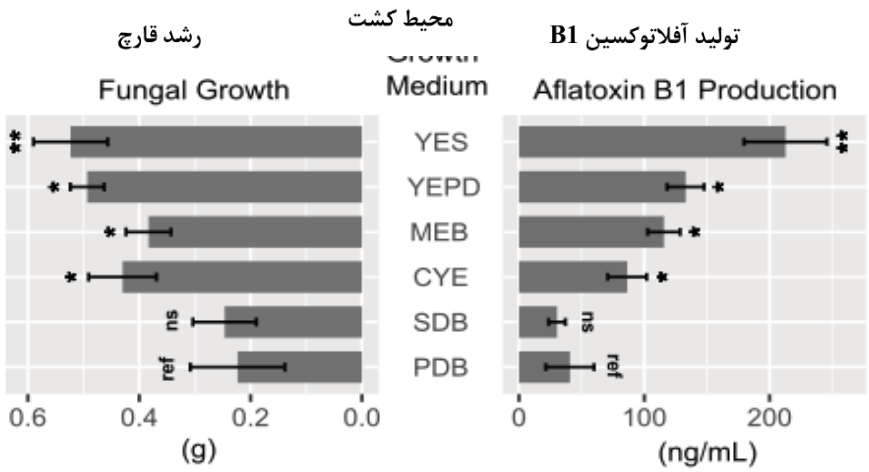
تجزیه‌وتحلیل داده‌ها

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 تجزیه‌وتحلیل‌های آماری با استفاده از آزمون تی (T-test) با دو نمونهٔ مستقل توسط نرم‌افزار آماری R نسخهٔ 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

ارزیابی بهترین محیط کشت برای رشد قارچ *A. flavus* و همچنین تولید آفلاتوکسین B1 براساس وزن خشک میسیلیوم 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-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).



نمودار۱. میزان رشد میسیلیوم 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-value <0.05؛ **معنی‌دار در سطح p-value <0.001

www.SID.ir

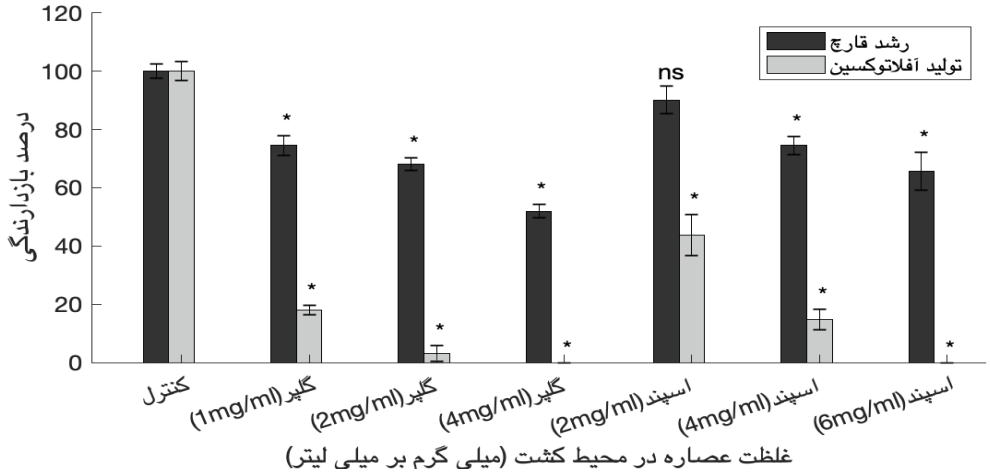
ارزیابی تأثیر عصاره‌ها بر رشد قارچ و تولید آفلاتوکسین B1

ارزیابی‌ها نشان داد که میزان بازدارندگی از رشد میسیلیوم قارچ *A. flavus*، برای غلظت‌های ۱، ۲، ۴ (mg/mL) عصارهٔ گلپر و غلظت‌های ۴ و ۶ (mg/mL) عصارهٔ اسپند، در سطح p-value <0.05 نسبت به تیمار کنترل (شاهد آلودهٔ 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 به‌ترتیب 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-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 بیوسنتز آفلاتوکسین B1

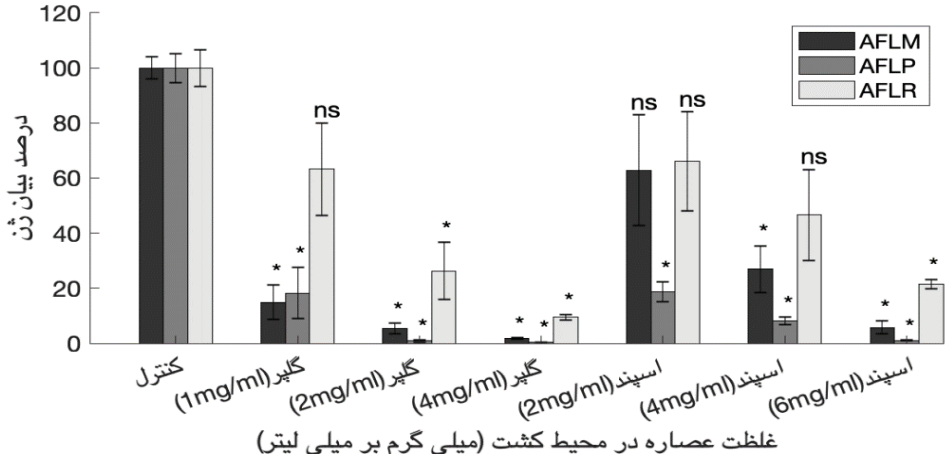
در این تحقیق دو ژن aflM و aflP موجود مراحل انتهایی خوشهٔ ژنی بیوسنتز آفلاتوکسین B1 و یک ژن تنظیمی aflR جهت انجام بررسی‌ها استفاده شد. سطح بیان ژن‌های aflM، aflP و aflR در قارچ *A. flavus* تیمارشده با غلظت‌های مختلف دو عصارهٔ گلپر و اسپند در نمودار ۳ نشان داده شده است. در مقایسه با شاهد، تمام ژن‌ها توسط غلظت‌های مختلف دو عصاره در سطوح مختلف تحت‌تأثیر قرار گرفت. از میان سه ژن موردبررسی، 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 عصارهٔ گلپر و غلظت ۲، ۴ و ۶ (mg/mL) عصارهٔ اسپند در سطح p-value<0.05 به‌صورت چشمگیری کاهش داشت. ژن aflM در غلظت‌های ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصارهٔ گلپر و غلظت‌های ۴ و ۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصارهٔ اسپند در سطح p-value<0.05 کاهش چشمگیری داشت.



نمودار۲. تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره‌ها بر تولید (AFB1) و رشد قارچ در *A. flavus* NRRL 3357. نتایج به‌عنوان درصد مهارکنندگی نسبت به کنترل (شاهد آلودهٔ 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-value<0.05

www.SID.ir

ژن تنظیمی aflR فقط در غلظت‌های ۲ و ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصارهٔ گلپر و ۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصارهٔ اسپند به ترتیب با ۷۴٪، ۹۰٪ و ۷۹٪ درصد در سطح p-value<0.05 کاهش چشمگیری را نشان داد. این نتایج نشان می‌دهد که عصاره‌های گلپر و اسپند در غلظت‌های مورداستفاده باعث کاهش بیان ژن‌های aflM، aflP و aflR موجود در خوشهٔ ژنی آفلاتوکسین B1 و درنهایت به کاهش تولید آفلاتوکسین B1 در ۷ روز پس از تیمار منجر می‌شود.



نمودار۳. تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره‌ها بر میزان بیان ژن‌های aflM، aflP و aflR در *A. flavus* NRRL 3357 در محیط کشت Yeast Extract Saccharose پس از ۷ روز. نتایج به‌عنوان درصد بیان نسبت به میزان بیان ژن در تیمار کنترل (شاهد آلودهٔ تیمارنشده با عصاره) بیان شده است. ns = بدون معنی؛ *معنی‌دار در سطح p-value <0.05

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 تجزیه‌وتحلیل آنالیز LC-MS و RT-qPCR مکانیسم این عصاره‌ها را در برابر تولید آفلاتوکسین B1 نشان دادیم.

نتایج مطالعهٔ 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 موردمطالعه کاهش یافته یا خاموش شد و درنهایت تولید آفلاتوکسین B1 کاهش یافت یا متوقف شد. این یافته‌ها ارتباط بین نتایج تجزیه‌وتحلیل LC-MS و RT-qPCR را نشان می‌دهد و بنابراین نمایانگر رابطهٔ میان دوز عصاره، میزان بیان ژن و تولید آفلاتوکسین B1 است.

خوشهٔ ژنی AFB1 توسط دو ژن تنظیم‌کنندهٔ 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 همهٔ ژن‌های aflM، aflP و aflR موجود در خوشهٔ ژنی آفلاتوکسین به‌طور کلی در غلظت‌های مختلف عصاره‌های گلپر و اسپند تحت‌تأثیر قرار گرفت و کاهش پیدا کرد. این کاهش برای ژن aflP که یکی از ژن‌های مراحل انتهایی سنتز آفلاتوکسین در خوشهٔ 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

www.SID.ir

میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصارهٔ گلپر و ۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصارهٔ اسپند در سطح p-value<0.05 کاهش چشمگیری را نشان داد. این موضوع را می‌توان به وظیفه و نقش تنظیمی این ژن نسبت داد و این‌گونه توجیه کرد که با توجه به اینکه بیان ژن‌های تنظیمی پایدارتر است حتی کاهش کم در بیان ژن تنظیمی aflR می‌تواند بر بیان سایر ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز 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 می‌توان نتیجه گرفت ژن تنظیمی aflR نسبت به سایر ژن‌ها هماهنگی کمتری با میزان تولید AFB1 دارد و از این رو برای بررسی مکانیسم مهارکنندگی آفلاتوکسین تحت‌تأثیر عصاره‌های مطالعه‌شده از کارایی کمتری برخوردار است.

در مطالعات گذشته نشان داده شده است که ترکیبات طبیعی می‌توانند با مکانیسم کاهش بیان ژن موجب مهار سنتز مایکوتوکسین‌ها شوند. Kong و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان دادند که بیان دو ژن تنظیمی aflR و aflS، بیان ژن‌های خوشهٔ ژنی AFB1 را تحت‌تأثیر قرار می‌دهد و در تشکیل آن نقش دارند (۳۸). در مطالعهٔ دیگر نشان داده شد که کورکومین به‌وسیلهٔ کاهش سطح بیان ژن‌های بیوسنتز آفلاتوکسین مانند pksA، ver-1، nor-1، omtA 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 ژن‌های aflD، aflM و aflP در *A. paraciticus* شد (۴۰). در تحقیقات دیگری بیان شده است که پیپرین تقریباً با مهار بیان همهٔ ژن‌های شرکت‌کننده در مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین تولید AFB1 در *A. flavus* را مهار کرد (۴۱).

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

این مطالعه کارایی عصارهٔ دو گیاه دارویی گلپر و اسپند را در کنترل تولید آفلاتوکسین B1 در سطح ژن نشان می‌دهد. براساس مطالعهٔ انجام‌شده نتیجه می‌گیریم که کاهش بیوسنتز آفلاتوکسین به‌دلیل کاهش سطح بیان ژن‌های اصلی موجود در خوشهٔ ژنی بیوسنتز آفلاتوکسین در اثر غلظت‌های بیان‌شده عصاره‌های گلپر و اسپند می‌باشد. با وجود این، باید توجه داشت که این بدان معنا نیست که این ژن‌ها هدف مولکولی مستقیم عصاره‌های گیاهی هستند. آن‌ها ممکن است از طریق چندین مکانیسم سلولی، از جمله سیگنالینگ سلولی، استرس اکسیداتیو و... روند تولید آفلاتوکسین را مختل کنند. نتایج این پژوهش به‌علت کارابودن این ترکیبات با وجود عدم تأثیر بر تنوع زیستی، اهمیت بسزایی در ایمنی زیستی دارد؛ بنابراین با توجه به خواص ضدمیکروبی و نگهدارندگی، این ترکیبات می‌توانند به‌عنوان مواد ایمن‌تر 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 طبیعی‌تر، شناسایی و معرفی طیف وسیع‌تری از ترکیبات طبیعی مؤثر می‌تواند برای کاهش مصرف مواد نگهدارندهٔ مصنوعی مفید باشد. تدوین تکنیک‌های قابل‌اعتماد جدید برای ازبین‌بردن آلودگی آفلاتوکسین مواد غذایی اهمیت بسیاری برای صنایع غذایی و دامی دارد. همچنین می‌توان از این نگرش در کاهش و تجزیهٔ آفلاتوکسین در داروهای گیاهی مستعد به آلودگی با آفلاتوکسین بهره برد.

اثرات ضدمیکروبی و ضدتوکسینی این عصاره می‌تواند حاکی از پتانسیل این ترکیبات به‌عنوان نگهدارنده‌های طبیعی مواد غذایی باشد و به کاهش استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی کمک کند. تفاوت در میزان اثرات ضدآفلاتوکسینی این دو عصاره مربوط به ترکیبات مؤثره هر گیاه است که موجب خصوصیات بیولوژیکی متفاوت می‌شود. 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 به‌علت خواص ارگانولپتیک و طعم مطلوب آن در فرآورده‌های غذایی برای جلوگیری از آلودگی‌های قارچی و

www.SID.ir

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 اولیهٔ آزمایشگاهی باشد؛ به‌عنوان مثال، میزان پروتئین، چربی و آب آزاد موجود در محصول می‌تواند در فعالیت ضدمیکروبی 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 به‌وسیلهٔ 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 عصارهٔ *Cistus incanus* در ماکادمیا باعث می‌شود مصرف‌کنندگان در معرض آفلاتوکسین B1 کمتری قرار بگیرند. مطالعهٔ آن‌ها نشان داد که عصارهٔ *C. incanus*، آفلاتوکسین B1 را در محیط YES به میزان ۹۰/۱ درصد و در ماکادمیا ۸۵/۹ درصد مهار می‌کند (۴۵). مطالعهٔ دیگر نشان داد که پاشش جداگانه سه عصارهٔ گیاهی شامل دارچین، میخک و آویشن دنایی 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 ضدمیکروبی و همچنین سایر خصوصیات درمانی که گویای پتانسیل بالای به‌کارگیری این ترکیبات است، از منابع ارزشمند طب سنتی استخراج شد و مطالعهٔ ما نشان می‌دهد که رویکردهای بیولوژیکی مبتنی بر استفاده از ترکیبات گیاهی می‌تواند به‌عنوان عوامل طبیعی نسبتاً بی‌خطر و مؤثری در برابر آلودگی آفلاتوکسین B1 به هنگام مصرف و ذخیره‌سازی در مواد غذایی موردمصرف برای انسان و دام باشد. علاوه بر این، در مطالعهٔ ما دو ژن ساختاری (aflM و aflP) و ژن تنظیمی (aflR) درگیر در بیوسنتز آفلاتوکسین B1 تأییدی بر مکانیسم کنترل این عصاره‌های گیاهی محسوب می‌شوند.

با توجه به اثرات اثبات‌شدهٔ درمانی ترکیبات این دو گیاه در مطالعات جدید، اثبات تأثیرات ضدمیکروبی 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 عصارهٔ تام گیاهان دارویی گلپر و اسپند بررسی شد و بررسی ترکیبات موجود در عصاره‌های گیاهی و خالص‌سازی آن‌ها و همچنین بررسی میزان مهار آفلاتوکسین هریک 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 ضدمیکروبی 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.

www.SID.ir

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 spergillus 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, Soyingbe 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.

www.SID.ir

19. Bayram O, Krappmann S, Ni M, Bok JW, Helmstaedt K, Valerius O, Braus-Stromeyer 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-Matbooat 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-Aghraḍ al-Ṭibbiyah wa al-Mabahith al-Alaiyah*. Edited by Tajbakhsh H. 2nd 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.

www.SID.ir

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. Yahyaraeyat 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.

www.SID.ir