Original Article

A Survey of the Effect of Licorice Plant Extract on *aflR* Gene Expression and Aflatoxin Production in *Aspergillus Parasiticus* via Real-time PCR

Rashin Mohseni[1], Ayat Nasrollahi Omran[2*], Fatemeh Norbakhsh[3], Sasan Rezaie[4], Hesameddin Hosseinjani[5]

1- M.Sc., Department of Microbiology, Faculty of Biology Sciences, Islamic Azad University of Tonekabon Branch, Tonekabon, Iran
2- Assistant Professor, Department of Medical Mycology, Faculty of Medicine, Islamic Azad University of Tonekabon Branch, Tonekabon, Iran
3- Assistant Professor, Department of Microbiology, Islamic Azad University of Varamin Branch, Varamin, Iran
4- Associated Professor, Department of Medical Mycology, Faculty of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
5- Ph.D. Candidate, Faculty of Pharmacology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

**Corresponding Address: P.O.Code: 4684161167, Department of Medical Mycology, Faculty of Medicine, Islamic Azad University of Tonekabon Branch, Tonekabon, Iran*
Email: ayat51@yahoo.co.in

Received: 16/Aug/2012, Accepted: 31/Oct/2012

Abstract

Objective: Aflatoxin is important in the food industry, in animal husbandry and the medical area; there are enormous negative economic impacts due to this toxin. Numerous studies have researched extracts and plant compounds with the intent to reduce the growth of aflatoxin-producing organisms, inhibit toxin production and suppress the major toxin encoded genes (i.e., *aflR*) in these organisms. Licorice is an important plant in traditional medicine that possesses numerous antimicrobial activities. There is no report regarding the effects of licorice or its mechanism of action on the aflatoxin-producing *Aspergillus* species. The present study focuses on the inhibitory effects of licorice extract on *aflR* gene expression and the growth and survival of *Aspergillus parasiticus (A. parasiticus)*.

Methods: After the culture of *A. parasiticus* in toxin-inducer medium, we measured the minimal inhibitory concentration (MIC) for licorice extract. The aflatoxin concentration in the control and treated media was determined by HPLC. After harvesting the fungi from the toxin-inducing medium, its mRNA was extracted and cDNA synthesized by universal primers. The quantitative change in the *aflR* expression was analyzed via real-time PCR. Statistical analysis was performed by SPSS (v16).

Results: The production of fungal mycelium decreased with increasing concentrations of licorice extract. The highest inhibitory concentration observed was 500 mg/ml of the extract. HPLC analyses revealed that the 10 mg/ml concentration of licorice extract inhibited toxin production by 99.9%. At this concentration, *aflR* gene expression was suppressed up to 40% as documented by quantitative RT-PCR analysis.

Conclusion: Overall we concluded that the Licorice extract could inhibit the *aflR* gene expression and consequently the aflatoxin production efficiently in the *A. parasiticus*.

Keywords: Aflatoxin, *Aspergillus parasiticus*, Gene expression, *aflR* gene, Licorice extract

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 15, No 3, Autumn 2012, Pages: 63-77

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-30]

مقاله اصیل

بررسی اثر عصاره گیاه شیرین بیان بر روند تنظیم ژن *aflR* و روند تولید آفلاتوکسین در قارچ آسپرژیلوس پارازیتیکوس به روش Real Time PCR

راشین محسنی[1]، آیت نصرالهی‌عمران[2*]، فاطمه نوربخش[3]، ساسان رضایی[4]، حسام‌الدین حسینجانی[5]

۱- کارشناس ارشد، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن، تنکابن، ایران
۲- استادیار، گروه قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن، تنکابن، ایران
۳- استادیار، گروه میکروب‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین، ورامین، ایران
۴- دانشیار، گروه قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۵- دانشجوی دکتری تخصصی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تنکابن، کدپستی: ۴۶۸۴۱۶۱۱۶۷، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، دانشکده پزشکی، گروه قارچ‌شناسی پزشکی
Email: ayat51@yahoo.co.in

دریافت مقاله: ۹۱/۰۵/۲۶ پذیرش مقاله: ۹۱/۰۸/۱۰

چکیده

هدف: آفلاتوکسین در صنایع غذایی، دامپروری و حوزهٔ پزشکی اهمیت دارد و آسیب‌های اقتصادی فراوانی را سبب می‌شود. مطالعات زیادی روی عصاره‌ها و ترکیبات گیاهی برای کاهش رشد میکروارگانیسم‌های مولد آفلاتوکسین، عدم تولید سم توسط این ارگانیسم‌ها و سرکوب نمودن ژن اصلی مولد این توکسین یعنی *aflR* در جریان است. از گیاهانی دارای اهمیت در طب سنتی ما که آثار ضد میکروبی از خود نشان داده، شیرین بیان است. هنوز گزارشی از آثار یا مکانیسم‌های اثر آن بر قارچ‌های آسپرژیلوس مولد آفلاتوکسین وجود ندارد. مطالعهٔ کنونی به بررسی اثر عصاره شیرین بیان بر مهار رشد آسپرژیلوس پارازیتیکوس و بیان ژن *alfR* توسط این ارگانیسم می‌پردازد.

مواد و روش‌ها: پس از کشت آسپرژیلوس پارازیتیکوس در محیط محرک تولید آفلاتوکسین، حداقل غلظت بازدارندگی از رشد قارچ تحت اثر عصارهٔ شیرین بیان اندازه‌گیری شد. غلظت آفلاتوکسین در محیط‌های کنترل و تیمار شده به روش HPLC سنجیده شد. همچنین این قارچ از محیط محرک توکسین جدا و mRNA آن استخراج شد. سپس با استفاده از آغازگرهای عمومی cDNA آن سنتز و تغییر در بیان ژن *aflR* به‌طور کمّی و با استفاده از PCR در زمان واقعی بررسی شد. در نهایت تجزیه و تحلیل آماری توسط SPSS نسخه ۱٤ صورت گرفت.

نتایج: با افزایش غلظت عصاره شیرین بیان میزان تولید میسلیوم قارچ کاهش یافت. بیشترین میزان مهار کنندگی از رشد قارچ در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد. تجزیه و تحلیل نتایج HPLC نشان داد که مؤثرترین غلظت عصاره شیرین بیان، غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود که باعث مهار تولید توکسین به میزان ۹۹/۹۹ درصد شد. سنجش کمّی بیان ژن *aflR* تحت تأثیر عصاره شیرین بیان نشان داد که بیان این ژن تا میزان ٤۰ درصد مهار شده است.

نتیجه‌گیری: به‌طور کلی عصاره شیرین بیان می‌تواند به‌طور چشمگیری تأثیرات مهارکنندگی بر بیان ژن *aflR* و تولید آفلاتوکسین در قارچ آسپرژیلوس پارازیتیکوس داشته باشد.

کلیدواژگان: آفلاتوکسین، آسپرژیلوس پارازیتیکوس، بیان ژن، ژن *aflR*، عصاره شیرین بیان

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۵، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۱، صفحات: ۶۳-۷۷

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-30]

مقدمه

قارچ‌های جنس آسپرژیلوس (*Aspergillus*) به‌طور وسیع در محیط منتشر هستند. کلیه این گونه‌ها نسبت به حرارت مقاوم بوده و قادرند به راحتی خود را با محیط و بافت سازگار کنند و بیماری ایجاد نمایند. این قارچ‌ها جزئی از میکروفلور طبیعی آب و خاک هستند و در محیط‌های مختلف و حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت بیش از ۸۵ درصد واجد بهترین شرایط رشد هستند و مایکوتوکسین (Mycotoxins) تولید می‌کنند [۱] مایکوتوکسین‌ها متابولیت‌های بسیار متنوع تولید شده به‌وسیله قارچ‌ها است که موجب مسمومیت مصرف کنندگان مستقیم قارچ‌های مولد یا محصولات آلوده به آن‌ها می‌شود. در میان مایکوتوکسین‌ها آفلاتوکسین‌ها (Aflatoxins) به عنوان سردسته تمامی مایکوتوکسین‌ها مطرح است. آفلاتوکسین سمی با سمّیت بالا است که اغلب توسط آسپرژیلوس فلاووس (*Aspergillus flavus*) و آسپرژیلوس پارازیتیکوس (*Aspergillus parasiticus*) تولید می‌شود و به عنوان یکی از مهم‌ترین آلوده کنندگان محصولات کشاورزی مطرح است. آفلاتوکسیکوزیس (Aflatoxicosis) مسمومیت و عوارض حاصل از خوردن سم آفلاتوکسین روی مواد غذایی است و این سم در گونه‌های مختلف حیوانات و انسان می‌تواند سبب آثار زیان‌بار شود. آثار سم‌زایی (Toxigenic)، سرطان‌زایی (Carcinogenic)، جهش‌زایی (Mutagenic)، سرکوب‌گر ایمنی (Immunosuppressive) و ناقص‌زایی (Teratogenic) از جمله مهم‌ترین این عوارض است [۲]. آفلاتوکسین اغلب توسط آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس که از مهم‌ترین آلوده کنندگان محصولات کشاورزی به‌ویژه غلات، گندم و ذرت هستند، تولید می‌شود [۳]. حداقل ۲۳ واکنش آنزیمی در مسیر سنتز آفلاتوکسین دخالت دارد سنتز این سم طی یک سری واکنش‌های اکسیداسیون و احیا صورت می‌گیرد. در مسیر بیوسنتز این ماده بیش از ۲۳ ژن مستقر در خوشه ژنی ۷۵ کیلوبازی دخالت می‌کند. اغلب این ژن‌ها توسط مسیر اختصاصی پروتئین متصل شونده به DNA (AflR) که توسط ژن *aflR* تولید می‌شود تنظیم می‌گردند. پروتئین *aflR* به توالی پالیندرومی (Palindromic Sequence) واقع در پروموتر بسیاری از ژن‌های دخیل در بیوسنتز متصل شده و باعث افزایش رونویسی و سنتز آفلاتوکسین در آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس می‌شود یعنی *aflR* گروه ژن‌های مداخله کننده در نسخه‌برداری و تولید پروتئین آفلاتوکسین در قارچ‌های آسپرژیلوس نقش دارد [٤-٦]. در سال‌های اخیر مطالعه روی اثر گیاهان و عصاره‌ها و ترکیبات آن‌ها از جمله روغن‌های طبیعی بر مواردی چون کاهش رشد میکروبی و تأثیر بر میکروارگانیسم‌ها به نحو چشمگیری افزایش یافته است. علت این رویکرد را می‌توان برخورداری از منشأ طبیعی و نبود تقریبی عوارض جانبی نامطلوب در انسان و نیز در محیط زیست عنوان نمود. در سالیان اخیر خصوصیات ضد قارچی و ضد میکروبی بسیاری از عصاره‌های گیاهی اثبات شده است. در افرادی که دارای عفونت‌های قارچی یا تحت هجوم آن هستند این مواد طبیعی می‌تواند جایگزین مؤثر و سالمی به جای برخی مواد شیمیایی و داروها با تأثیرات مشابه باشد. این عصاره‌ها می‌تواند هم به صورت مستقل و هم به صورت مخلوط با سایرین استفاده شود [۷-۹]. از جمله گیاهان دارویی که آثار ضد میکروبی و قارچی آن به اثبات رسیده گیاه شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra*) است. گیاه شیرین بیان از تیره لگومینوزه (Leguminosae) است و هزاران سال است که در غذا و درمان‌های پزشکی استفاده می‌شود. قسمت مورد استفاده ریشه و ریزوم گیاه است و مواد مؤثر آن جزء دسته ساپونین گلیکوزیدها (Saponin Glycosides) است. به‌طور کلی می‌توان به وجود مواد تری‌ترپن (Triterpene)، فلاوونوئید (Flavonoids)، ایزوفلاوونوئید (Isoflavonoids) و کومارین (Coumarin) در عصاره شیرین بیان (Licorice extract) اشاره داشت [۱۰]. شیرین بیان هنوز برای سرفه، تنگی نفس و مشکلات تنفسی و همچنین برای اگزما و سایر مشکلات پوستی و سرماخوردگی تا بیماری‌های کبدی پیشنهاد می‌شود. این عصاره به سرکوب عفونت‌های بدن کمک می‌کند و باعث

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-30]

بالا بردن سیستم ایمنی در مبارزه با عامل بیماری‌زا می‌شود. شیرین بیان دارای خصوصیات ضد باکتریایی، ضد ویروسی و ضد قارچی است [۱۱، ۱۲]. از آن‌جایی که عصاره شیرین بیان دارای خواص ضد قارچی است می‌تواند رشد آسپرژیلوس نایجر (*Aspergillus niger*) و همین‌طور مخمر کاندیدا آلبیکانس (*Candida albicans*) را مهار کند. مکانیسم اثر این عصاره از طریق تأثیر بر غشای سیتوپلاسمی، تغییرات ریخت‌شناختی (Morphologic)، ممانعت از سنتز لیپید و تخریب دیواره سلولی است. از آن‌جایی که مواد موجود در شیرین بیان ضد میکروبی است، می‌تواند به عنوان آنتی‌بیوتیک نیز عمل کند. اما نحوه اثر عصاره شیرین بیان بر مهار رشد قارچ‌ها و عملکرد آن در کاهش تولید سم کاملاً مشخص نیست. این روش می‌تواند در تعیین اثر عصاره شیرین بیان مؤثر واقع شود. با توجه به موارد گفته شده بالا، کاوش عواملی که بتواند روی تولید مایکوتوکسین اثر گذاشته و باعث کاهش آن شود، همواره مورد توجه محققین بوده است؛ به‌همین دلیل محققان بررسی حاضر با توجه به خصوصیات ذکر شده، ضمن بررسی میزان تأثیر عصاره تغلیظ شده این گیاه دارویی روی میزان رشد قارچ مولد آفلاتوکسین، میزان تأثیر این عصاره را در شرایط آزمایشگاهی و در غلظت‌های مختلف حداقل غلظت مهار کننده (Minimum InhibitoryConcentration: MIC) بر بیان یکی از مهم‌ترین و کلیدی‌ترین ژن‌های خانواده Flavi Section آسپرژیلوس پارازیتیکوس یعنی ژن *aflR* به صورت کمّی و با استفاده از PCR در زمان واقعی (Real time PCR: RT-PCR) ارزیابی نمودند. این مطالعه با شناخت مکانیسم اثر عصاره شیرین بیان زمینه‌ساز مطالعات تکمیلی به منظور استفاده از ممانعت کننده‌های بیان ژن در طراحی و ساخت داروهای جدید ضد قارچ و ضد آفلاتوکسین است.

مواد و روش‌ها

این پژوهش یک مطالعه تحلیلی است که به مدت پانزده ماه از تاریخ ۸۹/۱۲/۱ الی ۹۱/۳/۱ در آزمایشگاه قارچ‌شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه تهران به انجام رسید. مراحل انجام کار به ترتیب زیر بود.

تهیه عصاره

برای تهیه عصاره به روش صعنتی، ریشه‌های شیرین بیان تهیه شده در مجاورت حلال آبی و در فشار ۲ بار و در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ تا ۳ ساعت جوشانده شد و پس از عمل هیدراسیون شیرهٔ حاصل آن به روش حرارت تغلیظ شد. پس از رساندن رطوبت آن به ۷ الی ۱۰ درصد عصاره را به صورت قالب یا پودر درآورده و استفاده شد. با توجه به این‌که تمامی شرایط فوق در دمای بالا، محیط استریل و رطوبت ۸ تا ۱۰ درصد انجام شد، امکان رشد میکروارگانیسم‌های مضر در آن وجود نداشت. عصارهٔ مذکور با آب مجدداً رقیق شد و پس از تهیه یک سوسپانسیون مایع از آن در غلظت‌های مختلف به محیط کشت قارچی مایع اضافه شد [۱۳].

تهیه سوش قارچی

برای انجام آزمایش یک سویه استاندارد آسپرژیلوس پارازیتیکوس توکسین‌زا (ATCC15517) استفاده شد. این سویه مولد آفلاتوکسین‌های B_1، B_2، G_1 و G_2 بود. این سویه روی محیط سابورود دکستروز آگار (Sabourad Dextrose Agar: SDA) (شرکتMerck ، آلمان) کشت داده شد و به مدت سه روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای انجام مطالعات بعدی از محیط کشت سابورود دکستروز براث (Sabourad Dextrose Broth) (شرکت Merck، آلمان) و محیط ژلوز سیب‌زمینی و دکستروز آگار (Potato Dextrose Agar: PDA) (شرکت Merck، آلمان) استفاده شد.

تهیه سوسپانسیون قارچی

برای به‌دست آوردن سوسپانسیون‌های یکنواخت یا همگن از غلظت قارچی یک معیار کدورت‌سنجی به نام استاندارد

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-30]

مک‌فارلند با درجه ۰/۵ به‌کار گرفته شد که ترکیبی حاوی باریوم کلراید و اسید سولفوریک بود. سوسپانسیون تهیه شده حاوی $۱/۵\times۱۰^{۸}$ سلول تخمین زده شد.

تهیه رقت‌های سریالی از عصاره آبی شیرین بیان

برای تهیه غلظت‌های مختلف از عصاره شیرین بیان در میکروپلیت‌های حاوی یک میلی‌لیتر محیط کشت مایع سابورود دکستروز براث از رقت اولیه عصاره شیرین بیان که با توزین ۱ گرم از عصاره در ۱ میلی‌لیتر آب مقطر استریل ایجاد شد (یک گرم در میلی‌لیتر) به اولین میکروپلیت اضافه شد و با انتقال یک میلی‌لیتر از هر میکروپلیت به میکروپلیت بعدی و دور ریختن یک میلی‌لیتر از میکروپلیت آخر، رقت‌های سریال کاهنده مورد نظر در میکروپلیت‌ها فراهم شد [۱٤، ۱۵].

مجاورسازی سوسپانسیون‌های قارچی با رقت‌های عصاره

در شرایط کاملاً استریل به هر میکروتیوپ حاوی رقت‌های مختلف عصاره ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون قارچی با کدورت استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند افزوده شد. همچنین ۲ میکروپلیت نیز با افزودن ۲ میلی‌لیتر محیط کشت سابورود دکستروز براث که یکی حاوی ۱۰۰ میکرولیتر اسپور قارچی و دیگری فاقد اسپور قارچی بود به عنوان کنترل‌های مثبت و منفی در نظر گرفته شد.

تعیین MIC

پس از انکوباسیون ٤۸ ساعته میکروتیوپ‌ها از نظر رشد میسلیوم‌های قارچی بررسی شد. بدین ترتیب که رشد میسلیوم‌های قارچی نمونه آزمون بیش از رشد میسلیوم قارچی نمونه کنترل به عنوان رشد ارگانیسم و در نتیجه عدم تأثیر عصاره شیرین بیان در نظر گرفته شد. در مقابل عدم رشد میسلیوم‌های قارچی در میکروپلیت نشان دهنده عدم رشد قارچ و تأثیر مثبت مهارکنندگی عصاره در رقت مورد نظر بود.

استخراج و جداسازی آفلاتوکسین توسط روش کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (High Performance Liquid Chromatography: HPLC)

۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون قارچی معادل‌سازی شده با ۰/۵ مک‌فارلند در غلظت‌های ۰/۵، ۲/۵، ۵، ۱۰ عصاره شیرین بیان در محیط PDA تلقیح شد و کشت‌ها در انکوباتور ۳۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک هفته نگهداری شد. همچنین از ۲ محیط PDA یکی به همراه ۵۰ میکرولیتر اسپور قارچی و دیگری حاوی ۲۵۰ میکرولیتر آفلاتوکسین استاندارد خالص به عنوان کنترل مثبت و کنترل استاندارد استفاده شد. کنترل منفی (Blank) نیز شامل محیط کشت PDA به تنهایی بود. پس از یک هفته مقدار ۲۵ گرم از محیط کشت‌های نمونه آزمون و کنترل به همراه کلونی قارچ توزین شد. سپس به آن ۲/۵ گرم NaCl با خلوص بالا و ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول به عنوان حلال استخراج افزوده شد و این مواد با بلندر با دور ۱۸۰۰۰ به مدت ۳ دقیقه یکنواخت شد و مواد یکنواخت شده از کاغذ صافی واتمن (Whatman) شماره ۱ عبورداده شد و داخل لوله فالکون ۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد. سپس به ۷ میلی‌لیتر از محلول فیلتر شده ۳۵ میلی‌لیتر PBS (Phosphate Buffered Saline) اضافه شد و از کاغذ صافی GFF (Glass Filter Paper) عبورداده شد. به ۲۵ میلی‌لیتر از عصاره رقیق شده ۵۰۰ میکرولیتر MeOH-HPLC افزوده سپس مجدداً ۷۵۰ میکرولیتر MeOH-HPLC به ستون افزوده و در چاهک جمع‌آوری شد سپس به چاهک مزبور ۱۷۵۰ میکرولیتر ظ H_2O-HPLC افزوده و با ورتکس (Vortex) مخلوط گردید و ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره به‌دست آمده درون دستگاه HPLC (Scanning Fluorescence Detector Water 474) تزریق شد [۱٦، ۱۷].

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-30]

استخراج RNA

پس از ٤ روز انکوباسیون RNA نمونه آزمون (حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره شیرین بیان) و نمونه کنترل به روش گوانیدین ایزوتیوسیانات (Guanidine Isothiocyanate) استخراج شد [۱۸].

طراحی آغازگر (Primer)

طراحی توالی آغازگر سنس (Sense) و آنتی‌سنس (Anti Sense) مورد استفاده، با توجه به توالی هدف یعنی توالی ژن *aflR* با استفاده از یک‌سری نرم‌افزار مخصوص و با رعایت اصول طراحی آغازگر، انجام شد. توالی آغازگرهای رشته سنس و رشته آنتی‌سنس مورد استفاده در زیر آمده است:

آغازگر سنس:

5′-Cgg-AAC-Agg-gAC-TTC-Cgg-C-<g>-3′

آغازگر آنتی‌سنس:

5′-ggg-Tgg-Cgg-ggg-ACT-CTg-A-<T>-3′

سنتز رشته cDNA و انجام RT-PCR

RT-PCR

برای سنتز cDNA به عنوان الگو در واکنش RT-PCR ابتدا غلظت و خلوص RNA استخراج شده به وسیله دستگاه اسپکتوفتومتر تعیین شد (میزان یکسانی از RNA هر دو نمونه یعنی ۱ میکروگرم در ۲۰ میکرولیتر استفاده شد) سپس با استفاده از کیت شرکت Fermentas (کانادا) (K1622) cDNA ساخته شد و پس از آماده‌سازی مواد برای انجام RT-PCR مخلوط مواد به میزان ٤٠ چرخه شامل واسرشتگی (Denaturation) ۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و اتصال (Annealing) ۲۰ ثانیه در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد و بسط (Extension) ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد و بتا اکتین نیز به عنوان یک سیستم کنترل داخلی تعیین شد.

انجام RT-PCR کمّی (quantitative RT-PCR: qRT-PCR)

مواد واکنش توسط کیت SYBR® Premix Ex Taq™ II از شرکت TakaRa ژاپن فراهم شد. برای انجام واکنش به ازای هر ۲۰ میکرولیتر از محلول واکنش، ۱ میگروگرم ازRNA استخراج شده گروه آزمون و کنترل، مورد استفاده و طبق برنامه کیت به cDNA تبدیل شد. همچنین بتا اکتین [ژنی با قابلیت ثبات در شرایط مختلف (House Keeping Gene) به منظور مقایسه و سنجش درستی بیان ژن] استفاده شد. برای انجام qRT-PCR از دستگاه Applied Biosystems Step One (ABI-USA) استفاده شد. این روش به روش سایبر گرین (Cyber Green) انجام شد و به عنوان فلوروفور (Fluorophore) زمینه از Rox استفاده شد. برنامه به‌کار گرفته شده برای انجام PCR کمّی به این صورت بود که مخلوط مواد برای ٤٠ چرخه که شامل واسرشتگی ۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و اتصال ۲۰ ثانیه در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد و بسط ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد.

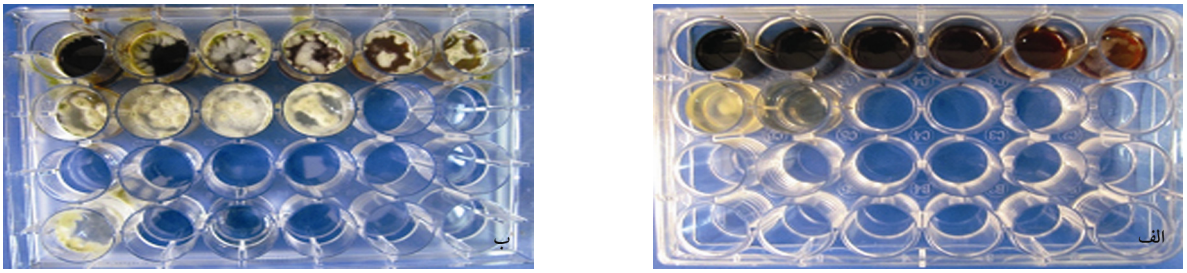
نتایج

بررسی اثر مهارکنندگی رشد عصاره آبی شیرین بیان روی آسپرژیلوس پارازیتیکوس انجام گرفت. نتیجه اثردهی رقت‌های مختلف عصاره شیرین بیان روی سوسپانسیون قارچی با کدورت استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند پس از دو و هفت روز انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در شکل ۱ نشان داده شد. چنانچه ملاحظه می‌شود MIC عصاره شیرین بیان در ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین شد.

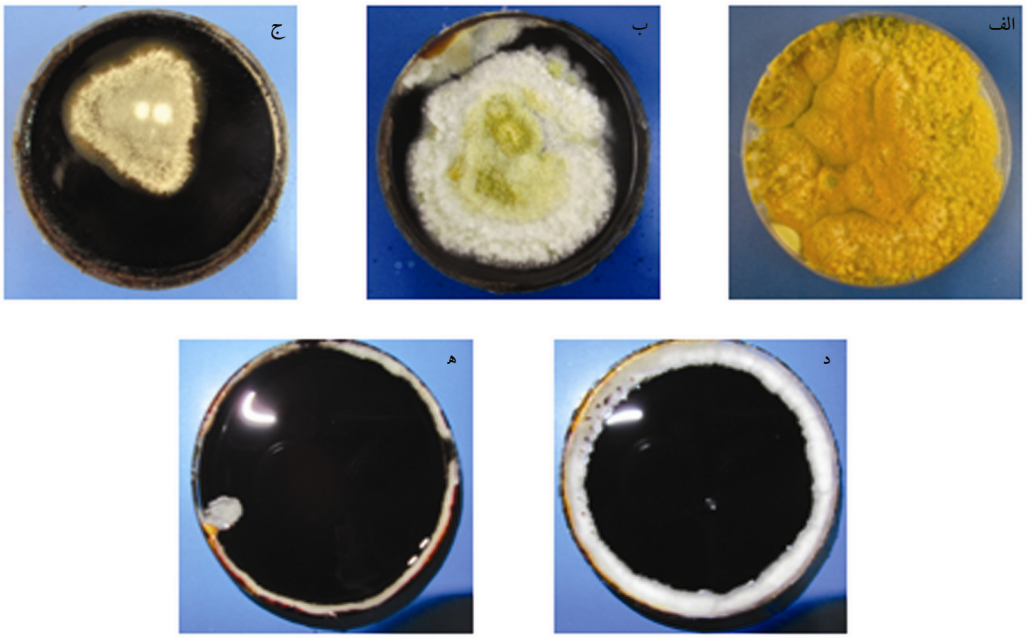
بررسی‌های ماکروسکوپی میکروپلیت‌ها نشان داد که با افزایش غلظت عصاره شیرین بیان میزان رشد قارچ کاهش یافته است و مقایسه میکروپلیت‌ها با کنترل مثبت توانایی مهار رشد قارچ توسط عصاره شیرین بیان را اثبات کرد و پس از انجام چندین بار MIC

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-30]

کمترین میزان MIC در میزان ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره شیرین بیان با غلظت ۱ گرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد. همچنین بررسی‌های ماکروسکوپی در پلیت‌ها میزان کاهش رشد قارچ را با افزایش عصاره به‌طور قابل ملاحظه‌ای نشان داد (شکل ۲).



شکل ۱ (الف) سطح کلونی آسپرژیلوس پارازیتیکوس در غلظت‌های مختلف عصاره شیرین بیان و کنترل در فاصله زمانی ۲ روزه، **(ب)** سطح کلونی آسپرژیلوس پارازیتیکوس در غلظت‌های مختلف عصاره شیرین بیان و کنترل در فاصله زمانی ۷ روزه

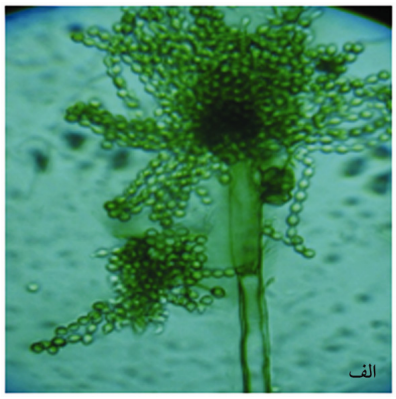


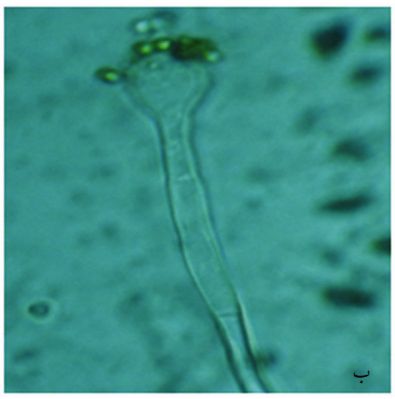
شکل ۲ (الف) نمونه کنترل مثبت، **(ب)** نمونه حاوی ۰/۵ میکرولیتر عصاره شیرین بیان، **(ج)** نمونه حاوی ۲/۵ میکرولیتر عصاره شیرین بیان، **(د)** نمونه حاوی ۵ میکرولیتر عصاره شیرین بیان، **(ه)** نمونه حاوی ۱۰ میکرولیتر عصاره شیرین بیان

بررسی‌های ماکروسکوپی پس از یک هفته نشان داد که در پلیت الف (کنترل مثبت) قارچ آسپرژیلوس پارازیتیکوس تمامی سطح پلیت را پوشاند و در پلیت ب با اضافه کردن ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره شیرین بیان رشد قارچ نسبت به نمونه کنترل کاهش یافت. با افزایش غلظت عصاره شیرین بیان روند کاهشی در رشد قارچ مشاهده شد به‌طوری که در غلظت ۱۰ میلی‌لیتر عصاره شیرین بیان میسیلیوم‌های قارچی به مقدار بسیار کم و به صورت نوار باریکی در حاشیه پلیت رشد کردند که در مقایسه با نمونه کنترل کاهش رشد قارچ به‌طور قابل ملاحظه‌ای مشاهده شد. همچنین در بررسی‌های میکروسکوپی، قارچ

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-30]

تحت تأثیر عصاره تغییراتی از جمله کاهش تولید میسیلیوم، کاهش سرهای کنیدی‌زا، کاهش کنیدی‌ها و تغییر رنگ کلونی از سبز به سفید را نسبت به قارچ کنترل نشان داد (شکل ۳). میزان سم که توسط آسپرژیلوس پارازیتیکوس در محیط کشت PDA حاوی غلظت‌های مختلف عصاره شیرین بیان، کنترل مثبت و منفی در فاصله زمانی ۷ روزه در انکوباتور ۳۰ درجه سانتی‌گراد تولید شد توسط دستگاه HPLC اندازه‌گیری و تفکیک شد (جدول ۱).





شکل ۳ بررسی میکروسکوپی **(الف)** قارچ کنترل، **(ب)** قارچ تحت تأثیر ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره شیرین بیان

جدول ۱ تجزیه و تحلیل نمونه‌های کنترل و آزمون حاوی تأثیر عصاره روی سم

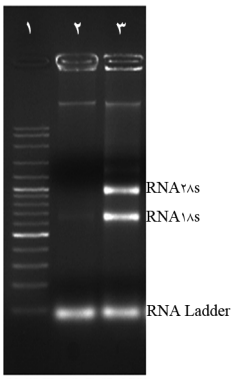
شماره	نام نمونه	مشخصات نمونه	AFL-B1 (برحسب PPM)	AFL-B2 (برحسب PPM)	AFL-G1 (برحسب PPM)	AFL-G2 (برحسب PPM)	مجموع
۱	کنترل منفی	۳۲۰۱۹۵-۰۰۸A	-	-	-	-	-
۲	حاوی سم استاندارد	۳۲۰۹۱۵-۰۰۹A	۳۱-۲۱/۱۶	۰-۲/۳٤	۰-۱۱/۷۱	۲/۰۸	۳۱-۳۷/۲۹
۳	کنترل مثبت	۳۲۰۹۱۵-۰۱۰A	۱۳۹٤۰۰-۱٦۸٦٤۰	۲۰۵۰-٤۷۰۰	۱۲۰۲۰-٦۱۱۲۰	۹۵۰-۲۰۲۰	۱۵٤٤۲۰-۲۳٦٤۸۰
٤	آزمون ۱	۳۲۰۹۱۵-۰۱۱A	۳۸٦۰/۵-۳۹۰۰	۲۷-۰	۱۱۳-٤۲۰	-	٤۰۰۰/۵-٤۳۲۰
۵	آزمون ۲	۰۱۲۳۲۰۹۱۵A	۹۱/٦-۲۰۲	-	۰-۱۰۱	-	۱۹۱/٦-۲۰۲
٦	آزمون ۳	۳۲۰۹۱۵-۰۱۳A	۱٤۲/۵-۱۵۰/۰۵	۰-٤/۵۵	٦/۹-٤/۲۷	-	۱٤۹/٤-۱۵۸/۸۷
۷	آزمون ٤	۳۲۰۹۱۵-۰۱٤A	۱۱/۱-۸/۵۵	-	۰-۳/۵	-	۱٤/٦-۸/۵۵

نمونه کنترل منفی: محیط کشت PDA، نمونه کنترل مثبت: محیط کشت PDA + قارچ، نمونه آزمون ۱: حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره شیرین بیان، نمونه آزمون ۲: حاوی ۲/۵ میلی‌لیتر عصاره شیرین بیان، نمونه آزمون ۳: حاوی ۵ میلی‌لیتر عصاره شیرین بیان، نمونه آزمون ٤: حاوی ۱۰ میلی‌لیتر عصاره شیرین بیان

در نمونه شماره ۱ (کنترل منفی) هیچ‌گونه آفلاتوکسینی جداسازی نشد. در نمونه شماره ۲ (سم استاندارد) انواع آفلاتوکسین‌های B_1، G_1، B_2، G_2 جداسازی شد که میزان کل انواع آفلاتوکسین‌ها ۳۷/۲۹ PPM (Parts Per Million) تخمین زده شد؛ در حالی که در نمونه شماره ۳ (کنترل مثبت) نه تنها تمامی انواع آفلاتوکسین‌ها جداسازی شدند بلکه میزان کل آفلاتوکسین‌های تولید شده ۲۳٦٤۸۰ PPM بود که در مقایسه با نمونه استاندارد سم تولیدی توسط قارچ آسپرژیلوس پارازیتیکوس بسیار بیشتر بود. در نمونه شماره ٤ که حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره شیرین بیان بود تنها B_1 و G_1 جداسازی شد و

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-30]

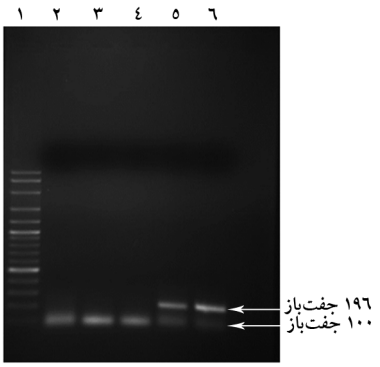
میزان کل آفلاتوکسین تولید شده ٤٣٢٠ PPM بود که در مقایسه با کنترل مثبت، عصاره شیرین بیان تولید سم را به مقدار قابل توجهی مهار کرد. در نمونه شماره ٥ که حاوی ٢/٥ میلی‌لیتر عصاره شیرین بیان بود تنها آفلاتوکسین B_1 جداسازی شد و میزان کل آفلاتوکسین تولید شده ٢٠٢ PPM بود. در نمونه شماره ٦ که حاوی ٥ میلی‌لیتر عصاره شیرین بیان بود میزان کل آفلاتوکسین جداسازی شده ١٥٨/٤٨٧ PPM بود و در نمونه شماره ٧ که حاوی ١٠ میلی‌لیترعصاره شیرین بیان بود، تنها آفلاتوکسین B_1 جداسازی شد و میزان کل آفلاتوکسین جداسازی شده ٨/٥٥ PPM بود که در مقایسه با کنترل مثبت که آفلاتوکسین تولیدی آن ٢٣٦٤٨٠ PPM بود، اختلاف معنی‌دار زیاد (با ٩٥ درصد اطمینان) در مهار تولید سم توسط غلظت ١٠ میلی‌لیتر عصاره شیرین بیان مشاهده شد. در نتیجه با افزایش غلظت عصاره شیرین بیان میزان تولید سم کاهش یافته بود به‌طوری که در غلظت ١٠ میلی‌لیتر عصاره شیرین بیان تولید سم ٩٩/٩٩ درصد مهار شد که این درصد کاهش به‌خصوص در ارتباط با سم B_1 چشمگیرتر بود.



شکل ٤ RNA های استخراج شده از نمونه کنترل و آزمون؛ **چاهک ١)** نشانگر، **چاهک ٢)** نمونه کنترل: محیط کشت و اسپور قارچ آسپرژیلوس پارازیتیکوس، **چاهک ٣)** نمونه آزمون: اسپور قارچی و غلظت ٥٠٠ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره شیرین بیان

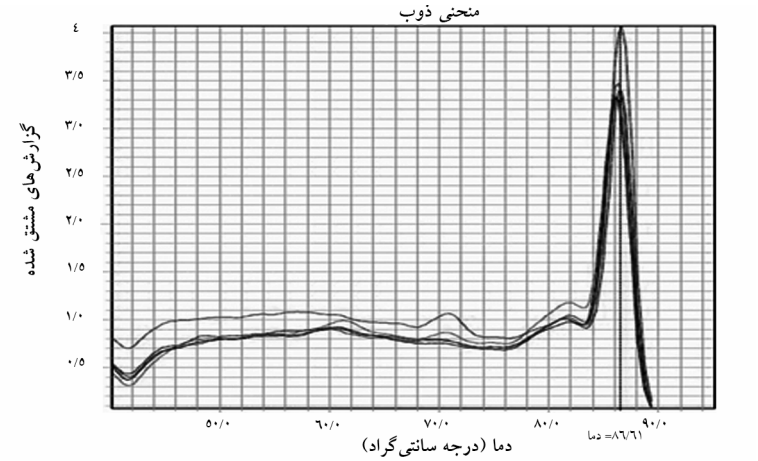
برای سنجش کمّی اثر مهاری عصاره شیرین بیان بر رونویسی ژن *aflR*، از روش RT-PCR و qRT-PCR استفاده شد. به همین دلیل به RNA هایی نیاز بود که خالص و به میزان فراوان از سلول استخراج شده باشد. استخراج RNA در ٢ گروه کنترل مثبت (قارچ آسپرژیلوس پارازیتیکوس) و آزمون حاوی ٥٠٠ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر انجام گرفت و باندهای ٢٨s، ١٨s و mRNA به طور مشخص قابل مشاهده بود (شکل ٤). برای اندازه‌گیری خلوص و میزان دقیق RNA از روش اسپکتروفتومتری استفاده شد. نتایج نشان دهنده وجود بیش از ١ میکروگرم از RNA استخراج شده از هر گروه با نسبت OD٢٦٠/OD٢٨٠>١/٧ [OD: Optical Density (جذب نوری)] بود که خلوص بالای RNA استخراج شده را نشان می‌داد.

بررسی نتایج میزان بیان ژن *aflR* قبل و بعد از تأثیر عصاره شیرین بیان به وسیله RT-PCR انجام گردید. مقایسه باندهای ایجاد شده مربوط به ژن *aflR* و بتا اکتین روی ژل آگارز نشان داد که میزان بیان ژن نمونه تحت تأثیر عصاره کمتر از نمونه کنترل ژن *aflR* است و عدم تغییر بیان ژن بتا اکتین در قارچ آسپرژیلوس پارازیتیکوس تحت تأثیر عصاره شیرین بیان نمایانگر قابل اعتماد بودن تأثیر عصاره شیرین بیان بر میزان بیان ژن *aflR* در قارچ آسپرژیلوس پارازیتیکوس است (شکل ٥).

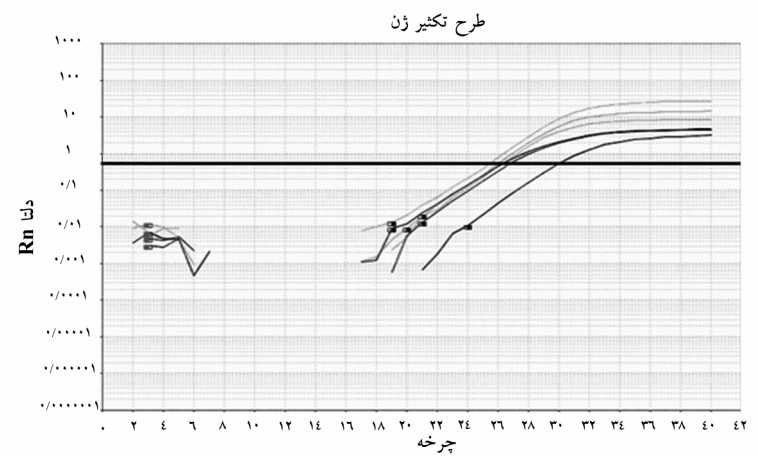


شکل ٥ محصول RT-PCR الکتروفورز شده در ژل آگارز؛ **چاهک ١)** نشانگر، **چاهک ٢)** نمونه کنترل منفی، **چاهک ٣)** ژن بتا اکتین تحت تأثیر ٥٠٠ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره شیرین بیان، **چاهک ٤)** ژن بتا اکتین (کنترل)، **چاهک ٥)** ژن *aflR* تحت تأثیر ٥٠٠ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره شیرین بیان، **چاهک ٦)** ژن *aflR* (کنترل)

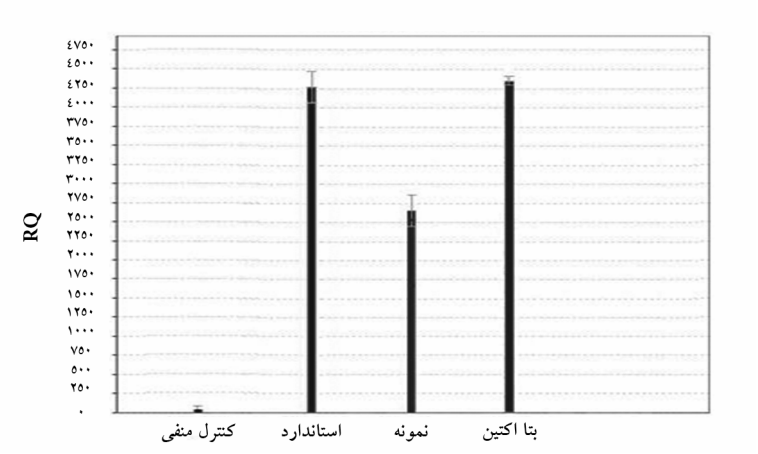
[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-30]



شکل ٦ نمودار منحنی دمای ذوب؛ وجود انحنا در این نمودار نشان دهنده یک دمای ذوب منحصر است که عدم وجود آلودگی و عملکرد اختصاصی آغازگرها را نشان می‌دهد.



شکل ۷ مقایسه بیان ژن *aflR* و بتا اکتین در حضور ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره شیرین بیان و نمونه کنترل



شکل ۸ مقایسه بیان ژن *aflR* و بتا اکتین در حضور ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره شیرین بیان و نمونه کنترل مثبت و منفی

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-30]

با استفاده از برنامه حرارتی و زمانی مناسب و آغازگرهای سنس و آنتی‌سنس بیان ژن *aflR* طی عمل RT-PCR سنجیده شد و به منظور اثبات بروز تغییرات ذکر شده در بیان ژن *aflR* در مجاورت عصاره شیرین بیان از یک ژن ثابت در قارچ مزبور (House keeping gene) به نام بتا اکتین استفاده شد. RT-PCR به روش سایبر گرین انجام شد و به عنوان فلوروفور زمینه از Rox استفاده شد. بررسی منحنی‌های به‌دست آمده نشان داد منحنی ژن *aflR* در نمونه‌های استاندارد تحت تأثیر هیچ‌گونه بازدارنده‌ای نبوده و کامل بود. از طرف دیگر؛ در نمونه‌های خالص شده که تحت اثر عصاره شیرین بیان قرار داشت، کاهش بیان مشاهده شد. سطح رونویسی ژن *aflR* تحت تأثیر غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره شیرین بیان به میزان ۳۹ درصد کاهش یافته بود. نمودارهای به‌دست آمده از انجام RT-PCR برای ژن *aflR* و بتا اکتین، نمایانگر منحنی‌های استاندارد (Standard Curve) مناسب و قابل قبولی برای این دو ژن بود و نمودار مربوط به دمای ذوب آن‌ها خلوص ژن و عدم وجود آلودگی را اثبات کرد (شکل ٦). از آن‌جایی که چرخه تکثیر ژن بین محدوده ۱۵-۳۵ قرار داشت نشان دهنده درستی واکنش بود. ژن *aflR* (خطوط قرمز رنگ) از چرخه ۲۸ تکثیر شده است در حالی که ژن *aflR* تحت تأثیر عصاره از چرخه ۳۱ شروع به تکثیر نموده بود و این مطلب خود نشان دهنده کاهش بیان ژن *aflR* تحت تأثیر عصاره بود. هیچ‌کدام از نقاط اوج (Peaks) ژن بتا اکتین (خطوط زرد رنگ) تفاوتی نسبت به هم در بیان شدن نشان نمی‌داد که این بیانگر ثبات داشتن بیان این ژن و عدم تأثیر عصاره مورد نظر بر آن بود (شکل ۷). از طرف دیگر؛ در نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل $\Delta\Delta C_T$ کاهش بیان نسبی ژن *aflR* به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل مشاهده شد (شکل ۸).

بحث

آفلاتوکسین‌ها گروه بزرگی از مایکوتوکسین‌ها است که به عنوان سردسته تمامی مایکوتوکسین‌ها و از جمله عوامل سرطان‌زای قوی در میان ترکیبات شناخته شده طبیعی مطرح است. به علت سمّیت بالای آفلاتوکسین‌ها در بسیاری از کشورها مقادیر مجاز آن‌ها در مواد غذایی بسیار محدود بوده و بر طبق توافقات صورت گرفته، در کمیته‌های تجارت جهانی مقدار مجاز این سموم در هر کیلو از مواد غذایی ۱۵ میکروگرم است. امروزه استفاده از گیاهان دارویی به علت برخورداری از منشأ طبیعی آن‌ها و نبود تقریبی عوارض جانبی نامطلوب در انسان در حال گسترش است. در سال‌های اخیر مطالعه روی عصاره‌ها و ترکیبات گیاهان در مواردی چون کاهش رشد میکروبی و تأثیر روی میکروارگانیسم‌ها در عدم تولید سم آثار چشمگیری را نشان داده‌است از جمله گیاهان دارویی که آثار ضد میکروبی و قارچی آن‌ها به اثبات رسیده است می‌توان به گیاه شیرین بیان اشاره نمود. هدف اصلی از مطالعه حاضر بررسی تأثیر عصاره شیرین بیان بر بیان ژن *aflR* در قارچ آسپرژیلوس پارازیتیکوس بوده است که در این بین تأثیر غلظت‌های مختلف این گیاه بر روی رشد قارچ و تولید سم نیز بررسی شد. براساس نتایج این تحقیق نیز عصاره شیرین بیان در غلظت‌های مورد مطالعه توانایی مهار رشد قارچ آسپرژیلوس پارازیتیکوس و همچنین جلوگیری از تولید انواع آفلاتوکسین را نشان داده است. با بررسی‌های انجام شده مشاهده شد که هر چه بر غلظت عصاره افزوده شود، میزان تولید میسیلیوم کاهش می‌یابد و بیشترین میزان MIC قارچ در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد. در این باره می‌توان به مطالعه هوجو (Hojo) و همکاران در ژاپن اشاره کرد که نتایج آنها نشان داد عصاره متانولی شیرین بیان تأثیر قارچ‌کشی بالایی علیه آرترینیوم ساکاری (*Arthrinium sacchari* M001) و چائتومیوم فونیکولا (*Chaetomium funicola* M002) دارد که احتمالاً تأیید کننده آثار ضد قارچی عصاره است که با نتایج تحقیق حاضر مشابهت دارد [۱۹]. در مطالعه گاپتا (Gupta) و همکاران درباره فعالیت ضد میکروبی ریشه شیرین بیان اشاره شده است که عصاره اتانولی ریشه شیرین بیان در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارای اثر مهاری روی دو گونه

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-30]

مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (*Mycobacterium tuberculosis*) $H_{37}Ra$ و $H_{37}Rv$ است [۲۰]. در این تحقیق نیز نتیجه مشابهی در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر حاصل شد با این تفاوت که عصاره استفاده شده از نوع عصاره آبی بود. به دلیل اهمیت آفلاتوکسین‌ها، به‌کارگیری و تکمیل روش‌های تجزیه و تحلیل آن به طور دایم بررسی می‌شود. در این میان از روش‌های الایزا (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA)، تولید فلورسانس در محیط کشت و کروماتوگرافی بهره گرفته شده است. HPLC به طور فزاینده‌ای به عنوان یک روش انتخابی در تعیین آفلاتوکسین‌ها به‌کار گرفته شده است. همچنین میزان سم تولید شده در نمونه‌های کنترل مثبت و منفی و نمونه‌های حاوی غلظت‌های مختلف‌های ۰/۵، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم عصاره مورد آزمایش توسط روش HPLC ارزیابی شده است و نتایج به‌دست آمده نشان داده است که تمامی غلظت‌های مورد مطالعه تا حد قابل ملاحظه‌ای تولید سم را کاهش می‌دهد و با افزایش غلظت عصاره نیز میزان سم تولید شده کمتر می‌شود. در این میان بیشترین میزان بازدارندگی تولید سم مربوط به نمونه حاوی ۱۰ میلی‌لیتر عصاره شیرین بیان بود که پس از گذشت ۷ روز کاهش ۹۹/۹۹ درصدی تولید سم را نسبت به نمونه کنترل ۷ روزه نشان داد. کاهش رشد و تولید آفلاتوکسین قارچ تحت تأثیر عصاره نسبت به نمونه کنترل پس از گذشت ۷ روز نمایانگر این مطلب بود که کاهش میزان رشد قارچ ممکن است بر میزان تولید سم آن نیز تأثیر گذار باشد. النـاگرابی (El-Nagerabi) و همکاران در سال ۲۰۱۲ تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره های آبی گل بامیه (*Hibiscus sabdariffa*) و اسانس شونیز (*Nigella sativa*) بر روی رشد و تولید آفلاتوکسین آسپرژیلوس ها را با استفاده از تکنیک HPLC بررسی کرده و نشان دادند که عصاره‌های این گیاهان قادر به مهار تولید آفلاتوکسین در آسپرژیلوس فلاووس به میزان ۹۱/۵–۹۷/۹ درصد و ۸۷/۵–۹۳/۳ درصد آسپرژیلوس پارازیتیکوس بودند. اسانس شونیز در غلظت‌های ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تولید آفلاتوکسین توسط آسپرژیلوس فلاووس را به میزان ۵۸/۳–۴۷/۹ درصد و آفلاتوکسین‌زایی آسپرژیلوس پارازیتیکوس را به میزان ۴۸–۳۲ درصد مهار کرد [۲۱]. برخلاف مطالعه حاضر که عصاره شیرین بیان توانست از رشد میسیلیوم‌های آسپرژیلوس پارازیتیکوس تا حد قابل ملاحظه‌ای جلوگیری نماید، در مطالعه النـاگرابی عصاره آبی گل بامیه و اسانس شونیز نتوانست رشد میسیلیوم‌های آسپرژیلوس فلاووس و پارازیتیکوس را در مقایسه با نمونه کنترلش مهار کند. راجانی (Rajani) و همکاران روی اثر مهاری عصاره‌های آبی چند گیاه بر رشد و تولید آفلاتوکسین آسپرژیلوس پارازیتیکوس (NCIM 898) کار کردند و میزان سم را توسط روش HPLC سنجیدند. فعالیت ضد قارچی عصاره آبی ۵ گیاه کاسیا آلاتا (*Cassia alata*)، پونیکا گراناتوم (*Punica granatum*)، پولیانتیا لانگیفولا (*Polyanthia longifola*)، داتورا استرامونیوم (*Datura stramonium*)، آنونا اسکواموزا (*Annona squamosa*) در غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درصد روی آسپرژیلوس پارازیتیکوس سنجیده شد و بیشترین میزان مهار رشد مربوط به عصاره آبی برگ‌های پولیانتیا لانگیفولا به میزان ۷۳ درصد بود. در غلظت‌های مختلف عصاره‌های نامبرده به غیر از غلظت ۵ درصد، مهار وجود داشت در صورتی که در مطالعه حاضر تمامی غلظت‌های ۰/۵، ۲، ۵، ۱۰ میلی‌گرم عصاره شیرین توسط دستگاه HPLC بیان توانایی مهار رشد و تولید آفلاتوکسین را به میزان قابل ملاحظه‌ای نشان دادند و میزان مهار توکسین در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در حدود ۹۹/۹۹ درصد بود که نشان دهنده اثر مهاری بالای عصاره مزبور بود [۲۲]. علاوه بر ارتباطی که بین کاهش رشد قارچ تحت تأثیر عصاره و تولید سم وجود دارد ممکن است کاهش تولید سم به فرایند بیوسنتز آفلاتوکسین ارتباط داشته باشد که این اثر می‌تواند در نتیجه مهار یکی از واکنش‌های آنزیمی و یا ژن‌های دخیل در مسیر سنتز آفلاتوکسین باشد. ژن *aflR* یک ژن تنظیم کننده مثبت در بیوسنتز آفلاتوکسین است و در اولین مرحله که نورسولورینیک اسید تشکیل می‌شود نیاز به آلل‌های *aflR* عملکردی است. این

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-30]

ژن درعمل نسخه‌برداری اغلب ژن‌های ساختمانی در آسپرژیلوس فلاووس، آسپرژیلوس پارازیتیکوس و آسپرژیلوس نیدولانس (*Aspergillus nidulans*) مورد نیاز است. مطالعات زیادی روی ژن aflR طی سالیان گذشته انجام شده است. از آن جمله می‌توان به مطالعه یو (Yu) و همکارانش در مصر اشاره کرد؛ نتایج این بررسی نشان داد که بیان ژن لیپاز (mRNA) تحت شرایط القای سوبسترا با تولید آفلاتوکسین آسپرژیلوس پارازیتیکوس و فلاووس در ارتباط بوده و سوبسترای لیپیدی باعث القا و پیشرفت تولید آفلاتوکسین می‌شود [۲۳].

اشمیت هید (Schmidt-Heydt) و همکارانش در آلمان اثر ترکیبات مختلف آب و دما در تنظیم بیان ژن‌های سنتز آفلاتوکسین آسپرژیلوس فلاووس را بررسی کردند. تجزیه و تحلیل ژن‌ها از طریق میکروآرایه (Microarray) و با استفاده از محیط کشت YES (Yeast Extract Sucrose) و یک‌سری پارامترها انجام شد. در حالی که شرایط استرس القای ژن‌های سنتز کنندهٔ آفلاتوکسین B_1 کم بود تناسب بیان *aflr* به *aflj* با افزایش سنتز آفلاتوکسین مرتبط بود [۲٤]. در تحقیق حاضر نشان داده شد که میزان بیان ژن *aflR* در قارچ آسپرژیلوس پارازیتیکوس تحت اثر عصاره شیرین بیان تغییر نموده و این تغییر توسط روش RT-PCR در حدود ٤۰ درصد تخمین زده شد. به طور کلی عصاره شیرین بیان می‌تواند تأثیرات مهارکنندگی بر رشد، تولید آفلاتوکسین و بیان ژن *aflR* قارچ آسپرژیلوس پارازیتیکوس داشته باشد و از آن‌جایی که این تحقیق در جای خود به عنوان اولین مطالعه جامع و اساسی در تأثیرگذاری عصاره شیرین بیان بر بیان ژن *aflR* در قارچ آسپرژیلوس پارازیتیکوس است، انجام مطالعات و بررسی‌های تکمیلی پیشنهاد می‌شود. بنابراین فرضیه این بررسی با عنوان این‌که عصاره شیرین بیان بر روند تنظیم بیان ژن *aflR* و روند تولید آفلاتوکسین در قارچ آسپرژیلوس پارازیتیکوس مؤثر است اثبات شده است.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته میکروب‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن بوده که با همکاری مرکز قارچ‌شناسی پزشکی دانشکده بهداشت دانشگاه تهران انجام گرفت. بخش عمده هزینه‌های مالی این طرح توسط دانشجو و قسمتی نیز توسط دو مرکز فوق و استاد راهنما تأمین شده است. سازمان انتشار مقاله دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن است. نویسندگان مراتب احترام و قدردانی خود را نسبت به کلیه همکاران و کارکنان آزمایشگاه قارچ‌شناسی دانشکده بهداشت مرکز گیشا به دلیل همکاری در اجرای این تحقیق اعلام می‌دارند.

منابع

[1] Okuda T, Klich M.A, Seifert K.A, Ando K. Media and incubation effects on morphological characteristics of *Penicillium* and *Aspergillus*. Singapore: Harwood Academic Publishers, 2000; p: 83-99.

[2] Abou-Bakr S. Effect of some plant extracts on fungal and aflatoxin production. Int J Acad Res 2011; 3(4): 116.

[3] Whitaker TB. Detecting mycotoxins in agricultural commodities. Mol Biotechnol 2003; 23(1): 61-71.

[4] Watson AJ, Fuller LJ, Jeenes DJ, Archer DB. Homologs of aflatoxin biosynthesis genes and sequence of *aflR* in *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae*. Appl Environ Microbiol 1999; 65(1): 307-10.

[5] Woloshuk CP, Prieto R. Genetic organization and function of the aflatoxin B1 biosynthetic

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-30]

genes. FEMS Microbiol Lett 1998; 160(2): 169-76.

[6] Yu J, Chang PK, Ehrlich KC, Cary JW, Bhatnagar D, Cleveland TE, Payne GA, Linz JE, Woloshuk CP, Bennett JW. Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. Appl Environ Microbiol 2004; 70(3): 1253-62.

[7] Razzaghi-Abyaneh M, Shams-Ghahfarokhi M, Yoshinari T, Rezaee MB, Jaimand K, Nagasawa H, Sakuda S. Inhibitory effects of *Satureja hortensis* L. essential oil on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. Int J Food Microbiol 2008; 123(3): 228-33.

[8] Razzaghi-Abyaneh M, Shams-Ghahfarokhi M, Rezaee MB, Jaimand K, Alinezhad S, Saberi R, Yoshinari T. Chemical composition and antiaflatoxigenic activity of *Carum carvi* L., *Thymus vulgaris* and *Citrus aurantifolia* essential oils. Food Cont 2009: 20(11): 1018-24.

[9] Alinezhad S, Kamalzadeh A , Shams-Ghahfarokhi M, Rezaee MB, Jaimand K, Kawachi M, Zamani Z, Tolouei R, Razzaghi-Abyaneh M. Search for novel antifungals from 49 indigenous medicinal plants: *Foeniculum vulgare* and *Platycladus orientalis* as strong inhibitors of aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. Ann Microbiol 2011; 61: 673-81.

[10] Akram M, Uddin S, Ahmed A, Usmanghani K, Hannan A, Mohiuddin E, Asif M, Ali Shah SM. *Glycyrrhiza glabra* L. (Medicinal uses). JMPR 2011; 5(25): 5658-61.

[11] Nitalikar MM, Munde KC, Dhore BV, Shikalgar SN. Studies of Antibacterial Activities of *Glycyrrhiza glabra* Root Extract. Int J Pharm Tech Res 2010; 2(1): 899-901.

[12] Ohuchi K, Tsurufuji A. A study of the anti-inflammatory mechanism of glycyrrhizin. Mino Med Rev 1982; 27: 188-93.

[13] Aly MA, Al-Alousi L, Salem HA. Licorice: A possible anti-inflammatory and anti-ulcer drug. AAPS Pharm Sci Tech 2005; 6(1): E74-E82.

[14] NCCLS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved standard NCCLS document M27-M30. Wayne (PA): National Committee for Clinical Laboratory Standards; 2002.

[15] Turnidge JD, Ferraro MJ, Jorgensen JH. Susceptibility Test Methods: General Considerations. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Yolken RH (editors). Manual of Clinical Microbiology. Washington D.C: American Society for Microbiology Press. 8th Ed, 2003; p: 1103.

[16] Barbas C, Dams A, Major RE. Separation of Aflatoxins by HPLC. Enviromental Food Safety. 2005; http://www.chem.agilent.com/Library/applications/5989-3634EN.pdf.

[17] Ouattara-Sourabie PB, Nikiema PA, Barro N, Savadogo A, Traore AS. Aflatoxigenic potential of *Aspergillus* spp. isolated from groundnut seeds, in Burkina Faso, West Africa. Afr J Microbiol Res 2012; 6(11): 2603-9.

[18] Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. Nat Protoc 2006; 1(2): 581-5.

[19] Hojo H, Sato J. Antifungal Activity of Licorice (*Glycyrrhiza glabra* Linn) and Potential Applications in Beverage Foods. J Food Ingredients 2002; 203: 45-9.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-30]

[20] Gupta VK, Fatima A, Faridi U, Negi AS, Shanker K, Kumar JK, Rahuja N, Luqman S, Sisodia BS, Saikia D, Darokar MP, Khanuja SP. Antimicrobial potential of *Glycyrrhiza glabra* roots. J Ethnopharmacol 2008; 116(2): 377-80.

[21] El-Nagerabi SAF, Al-Bahry SN, Elshafie A, AlHilali S. Effect of *Hibiscus sabdariffa* extract and *Nigella sativa* oil on the growth and aflatoxin B_1 production of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* strains. Food Cont 2012; 25(1): 59-63.

[22] Rajani P, Sridevi V, Chandana Lakshmi MVV, Kiran Kumari SP. Inhibitory effect of aqueous plant extracts on the growth of aflatoxin producing *Aspergillus parasiticus* (NCIM 898). IJESAT 2012; 2(2): 365-71.

[23] Yu J, Mohawed SM, Bhatnagar D, Cleveland TE. Substrate-induced lipase gene expression and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. J Appl Microbiol 2003; 95(6): 1334-42.

[24] Schmidt-Heydt M, Abdel-Hadi A, Magan N, Geisen R. Complex regulation of the aflatoxin biosynthesis gene cluster of *Aspergillus flavus* in relation to various combinations of water activity and temperature. Int J Food Microbiol 2009; 135(3): 231-7.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-30]