DOI: 10.22092/VJ.2021.354684.1851
شماره ۱۳۵ تابستان ۱۴۰۱
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

ارزیابی اثر ضدقارچی تیمول و تاثیر آن بر بیان ژن *NOR1* در جدایه‌های آسپرژیلوس فلاووس

• **سید امیرعلی انوار**
گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
• **حمید مهدی‌پور**
گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
• **نکیسا سهرابی‌حقدوست (نویسنده مسئول)**
گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰-۰۳-۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰-۰۶-۲۸
Emali: Sohrabi.nakisa@gmail.com

چکیده

سابقه و هدف: ترکیبات فنلی بعنوان مهم‌ترین ماده با خاصیت ضدمیکروبی و نیز به عنوان اجزای فعال اسانس‌هایی مانند آویشن شیرازی و مرزه شناخته شده‌اند. هدف از مطالعه حاضر ارزیابی تاثیر تیمول بر روی رشد و بیان ژن *nor1* در ایزوله‌های آسپرژیلوس فلاووس است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه اثر ضدقارچی تیمول بر روی آسپرژیلوس فلاووس مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین ارزیابی میزان بیان ژن *nor1* نمونه‌های تحت تیمار با تیمول پس از کشت در محیط اختصاصی YES با روش Real Time- PCR تعیین گردید.

یافته‌ها: میزان کمترین غلظت مهارکننده (MIC) تیمول بر روی جدایه‌های آسپرژیلوس فلاووس بین ۴۰۰ µg/ml تا ۲۰۰ متغیر بود. آنالیز میزان بیان ژن با روش Real Time- PCR نشان داد که تیمول باعث کاهش بیان ژن *nor1* در جدایه‌های آسپرژیلوس فلاووس مورد مطالعه گردید. میزان بیان ژن *nor1* در هر یک از جدایه‌های حساس و مقاوم به ترتیب ۰/۰۶ و ۱/۶۹ درصد محاسبه گردید.

نتیجه‌گیری: با توجه به اینکه نخستین مرحله در تولید این توکسین بیان یک آنزیم ردوکتازی ژن *nor1* برای تبدیل *nor1* (نورسولورینیک اسید) به آفلاتوکسین می‌باشد، لذا عدم بیان آن مسیر تولید توکسین را متوقف می‌نماید. در این مطالعه نشان داده شد که تیمول می‌تواند دارای اثرات مهارکنندگی بر روی رشد و بیان ژن *nor1* داشته باشد. ازآنجایی که آلودگی مواد غذایی به آفلاتوکسین برای سلامت عمومی یک تهدید بشمار می‌رود استفاده از ترکیبات و فراورده‌های طبیعی جهت کاهش آلودگی مواد غذایی امری ضروری می‌باشد.

کلمات کلیدی: آسپرژیلوس، تیمول، *nor1*

● Veterinary Researches & Biological Products No 135 pp: 69-78

Evaluation the antifungal effect of thymol and its effect on *NOR1* gene expression in Aspergillus flavus isolates

By: ., *Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.* ., *Department of Food Science and Technology, Faculty of Agricultural Sciences and Food Industry, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. and* , *(Corresponding Author) Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.*

Received: 2021-05-31 **Accepted: 2021-09-19**

Emali: Sohrabi.nakisa@gmail.com

Background and Objectives: Phenolic compounds are known as the most important substance with antimicrobial properties and also as active components of essential oils such as thyme and savory. The aim of this study was to evaluate the effect of thymol on the growth and expression of nor1 gene in Aspergillus flavus isolates.

Material and methods: In this study, the antifungal effect of thymol on Aspergillus flavus was evaluated. Also, evaluation of nor1 gene expression of samples treated with thymol after culture in YES specific medium was determined by Real Time-PCR.

Results: The minimum inhibitory concentration (MIC) of thymol on Aspergillus flavus isolates ranged from 400 to 200 g / ml. Analysis of gene expression by Real Time-PCR method showed that thymol reduced the expression of nor1 gene in Aspergillus flavus isolates. The expression of nor1 gene in each of the sensitive and resistant isolates was calculated to be 0.06% and 1.69%, respectively.

Conclusion: Due to the fact that the first step in the production of this toxin is the expression of a reductase enzyme of the nor1 gene to convert *NOR1* (norsuluronic acid) to aflatoxin. Therefore, the lack of expression of this gene inhibit the production of toxins. In this study, it was shown that thymol can have inhibitory effects on the growth and expression of nor1 gene Because food contamination with aflatoxins is a threat to public health, the use of natural compounds and products is essential to reduce food contamination.

Keywords: Aspergilus flavus, thymol, *nor1*

مقدمه

نگهداری از مواد غذایی یک مرحله بسیار مهم در صنایع غذایی است به این خاطر که ایمنی، خواص فیزیکی و شیمیایی محصول و همچنین ارزش تغذیه‌ای آن را به صورت همزمان تحت تاثیر قرار می‌دهد برخی از میکروارگانیسم‌ها می‌توانند بر اثر رشد در ماده غذایی سودمند تلقّی شود، امّا گروهی دیگر از میکروارگانیسم‌ها می‌توانند باعث فساد در مواد غذایی شوند. قارچ‌ها می‌توانند باعث آلودگی محصولات زراعی متعددی قبل و بعد از برداشت شوند و از عوامل اصلی فساد مواد غذایی شوند که برخی از آنها مانند گونه‌های فوزاریوم، پنی‌سیلیوم و آسپرژیلوس قادر به تولید مایکو توکسین‌ها هستند و به عنوان عوامل تهدیدکننده حیات انسان‌ها و حیوانات شناخته شده‌اند(۵). در میان مایکوتوکسین‌ها آفلاتوکسین‌ها به عنوان سردسته تمامی مایکوتوکسین‌ها مطرح است. آفلاتوکسین، ماده‌ایی با سمیت بالا است که اغلب توسط آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس تولید می‌شود و به عنوان یکی از مهم‌ترین آلوده‌کنندگان محصولات کشاورزی مطرح است و آلودگی محصولات به آفلاتوکسین قبل از برداشت و عملیات برداشت ناکارآمد محصول و نگهداری نامناسب در شرایط نامطلوب در طی فرایند انتقال، بازاریابی و پردازش منجر به رشد قارچ و افزایش ریسک تولید مایکوتوکسین می‌گردد(۴). علی‌رغم پیشرفت تکنیک‌های تولید مواد غذایی، ایمنی مواد غذایی یک مسیله مهم در بهداشت عمومی می‌باشد. (۷ و۲۳). از آن‌جایی که آسپرژیلوس فلاووس میزبان اختصاصی ندارد، می‌تواند باعث آلودگی دانه‌های بالاتر از سطح زمین و زیر زمین مانند بادام زمینی شود. آسپرژیلوس فلاووس می‌تواند در شرایط آب و هوایی مناسب رشدکرده و باعث فساد دانه‌های غذایی و ضرر و زیان اقتصادی می‌گردد. آفلاتوکسین نوع B1 و B2 بیشتر توسط قارچ آسپرژیلوس فلاووس تولید می‌شود در حالی‌که آفلاتوکسین‌های نوع B۱، B2، G1 و G2 توسط آسپرژیلوس پارازیتیکوس تولید می‌گردد. نام‌گذاری آفلاتوکسین بر مبنای حرکت آنهاکروماتوگرافی لایه نازک بر روی ژل و رنگ آبی (Blue) و سبز (Green) آنها زیر نور فرابنفش، تعیین گردیده است. آفلاتوکسین B1، دارای بیشترین سمیت و خاصیت سرطان‌زایی را در انسان و حیوانات مانند جوندگان، ماهی‌ها و پرندگان دارا می‌باشد. مصرف مداوم این سم می‌تواند موجب سرکوب سیستم ایمنی، نکروز

کبدی و سرطان کبد شود (۴ و ۲۲).
استفاده مناسب از قارچ‌کش‌های شیمیایی در طول فرایند تولید می‌تواند میزان عفونت‌های قارچی را به حداقل برساند. با این حال استفاده از ترکیبات شیمیایی به دلایل اقتصادی و نگرانی فزاینده در مورد مسایل محیطی و ایمنی مواد غذایی ناامیدکننده می‌باشد. به طور موثر استفاده از مواد شیمیایی مصنوعی برای کنترل فساد مواد غذایی به دلیل سرطان‌زایی، تراریختگی، سمیت باقیمانده زیاد و سایر تاثیرات بر روی غذا، انسان و حیوانات محدود شده است (۲۰ و۲۳). مقاومت در برابر قارچ‌کش‌های شیمیایی نیز به یک مسیله مهم تبدیل شده است چنانچه نیاز به توسعه گزینه‌های جدید و ایمن و قابل تجزیه افزایش یافته است. اسانس‌ها مایعات روغنی معطر هستند که از مواد گیاهی مانند گل، جوانه‌ها، دانه‌ها، برگ‌ها، شاخه‌ها، پوست، گیاهان، چوب، میوه و ریشه به دست می‌آیند و علاوه بر خاصیت ضدباکتریایی خواص ضدویروسی (۶)، ضدقارچی(۱۲)، ضدانگل(۱۶)، ضدحشرات و ضدسم (۱۲و۲۰) دارند. این ویژگی‌ها به عملکرد این ترکیبات در گیاه مربوط می‌شود. در فعالیت ضدقارچی ترکیبات اسانس‌ها، ویژگی‌های چربی دوستی ساختمان هیدروکربنی و نیز آب دوستی گروه‌های تابع آن‌ها دارای اهمیت است. فعالیت ضدقارچی اسانس‌ها مرتبط با ترکیبات فنولی، آلدئیدی، کتونی؛ الکلی، اتری و هیدروکربنی می‌باشد که بیشترین فعالیت برای فنول‌های تیمول، کارواکرول و اوژنول گزارش شده است. و برخی از این عوامل روی غشای پلاسمایی یا روی مهار آنزیم‌های ساختاری غشای سلولی میکروارگانیسم‌ها موثر است و می‌تواند خواص ضدمیکروبی خود را اعمال نماید (۱۱) . ترکیبات فنلی احتمالا مهم‌ترین ماده ضدمیکروبی موجود در اسانس‌های ادویه‌ها هستند و به عنوان اجزای فعال اسانس‌هایی مانند تیمول شناخته شده‌اند (۱۰). مطالعه حاضر با هدف تعیین فعالیت ضدقارچی تیمول بر روی ۱۲ گونه قارچی آسپرژیلوس فلاووس و ارزیابی تاثیر آن بر بیان ژن *nor*۱ به عنوان فرآورده طبیعی انجام شده است.

مواد و روش کار

جداسازی نمونه‌های قارچ آسپرژیلوس فلاووس و تشخیص گونه قارچی

در فصل بهار و تابستان ۱۳۹۷ جهت جداسازی قارچ آسپرژیلوس فلاووس تعداد ۲۰ نمونه‌ی ۵۰ گرمی از خشکبار بادام زمینی، پسته، فندق، بادام درختی به صورت فرآوری شده و خام از چندین خشکبارفروشی به صورت تصادفی از استان‌های مختلف تهران، گیلان و مازندران خریداری و جمع‌آوری گردید (جدول ۱). نمونه‌ها مستقیماً پس از خریداری در پاکت‌های استریل و به دور از هرگونه رطوبت نگهداری شدند و سپس جهت ضدعفونی نمونه‌ها با استفاده از هایپوکلرات سه درصد به مدت ۵ دقیقه خیسانده شدند و بعد از آن طی دو مرحله با آب مقطر شستشو داده شدند و به آنها اجازه داده شد تا در دمای محیط خشک شوند. سپس هر کدام از نمونه‌ها بوسیله آسیاب پودر شدند. در مرحله بعد به میزان یک گرم از نمونه را با نه سی‌سی آب مقطر داخل لوله ریخته و مخلوط را به خوبی هم‌زده و ورتکس گردید و بعد از تهیه رقت‌های سریالی، از رقت مربوط به هر لوله در محیط کشت پوتیتو دکستروز آگار کشت داده شد و نمونه‌های قارچ آسپرژیلوس فلاووس جداسازی گردیدند. برای تشخیص نمونه‌های قارچ آسپرژیلوس فلاووس به منظور خالص‌سازی جدایه‌ها آن‌ها را بر روی محیط کشت پوتیتو دکستروز آگارکشت داده و سپس کلنی‌های رشدیافته جهت اطمینان برای خالص بودن، از روش کشت بر روی لام استفاده گردید. هر یک از جدایه‌ها با روش‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی مورد شناسایی قرار گرفت. تشخیص جدایه‌های قارچی با استفاده از ویژگی‌های ماکروسکوپی از جمله رشد کلونی، رنگ، بافت و رنگ پشت کلونی بعد از ۱۰ روز تلقیح انجام گردید و برای بررسی شکل میکروسکوپی با استفاده از رنگ‌آمیزی لاکتوفنل کاتن بلو در زیر میکروسکوپ، بررسی ساختارهای رویشی و زایشی، شکل وزیکول و نحوه قرارگیری سلول‌های کونیدی‌زا و کنیدی‌ها همچنین ساختار کونیدیوفور انجام شد.

تهیه تیمول و محلول کار اولیه

جهت تهیّه تیمول (C10H14O) محصول شرکت مرک آلمان، از شرکت مینا تجهیز آریا که واردکننده محصولات مرک بود با شماره کاتالوگ ۱,۰۸۱۶۷,۰۱۰۰ خریداری گردید. تیمول خریداری شده به صورت کریستالی بود.
برای تهیه محلول کار اولیه، یک گرم از تیمول در یک سی‌سی اتانول حل گردید و بر اساس غلظت محلول اولیه بر حسب میکروگرم در هر میلی‌لیتر از تیمول محلول کار تهیه شد، سپس غلظت‌های مختلفی از محلول کار از ۷۵۰ µg/ml تا ۱۷۵ در اتانول به عنوان حلال تهیه شد.

آزمون تعیین حساسیت جدایه‌های قارچی

در این مطالعه جهت تعیین حساسیت جدایه‌های قارچ مورد نظر نسبت

جدول ۱- مشخصات کامل نمونه‌های جداسازی شده به تفکیک تاریخ، محل نمونه‌برداری،وزن، نوع نمونه، تعداد، روش جداسازی و روش تایید قارچ.

بهار	محل	نام خشکبار	نوع نمونه	وزن	تعداد در هر نمونه	روش جداسازی	روش تایید
بهار و تابستان ۱۳۹۷	تهران مازندران گیلان	بادام زمینی پسته فندق بادام درختی	خام فرآوری شده	۵۰ گرم	۵ بسته	کشت در محیط سابورو دکستروز آگار (SDA) حاوی آنتی بیوتیک کلرامفنیکل	روش ماکروسکپی و میکروسکپی

به ماده تیمول از روش رقت‌سازی در محیط مایع طبق دستورالعمل استاندارد CLSI و به روش A۲-M۳۸ که روشی مرجع برای ارزیابی حساسیت قارچ‌های رشته‌ایی می‌باشد استفاده گردیده است. و میزان حساسیت جدایه‌ها به صورت کمترین غلظت مهارکننده و کشنده تعیین گردید. بدین منظور جهت تهیه سوسپانسیون قارچی از کشت هفت روزه جدایه‌های آسپرژیلوس فلاووس در لوله‌های حاوی محیط پوتیتو دکستروز آگار (ساخت شرکت مرک، آلمان) به صورت شیب‌دار استفاده گردید. و سوسپانسیون حاوی کنیدی در محلولی از توئین ۸۰ و سرم فیزیولوژی تهیه گردید و سپس با استفاده از لام نئوبار تعداد کنیدی‌های قارچی زیر میکروسکوپ شمارش و تعداد کنیدی‌های قارچی به میزان $۱۰^{۶}$ ×۵-۱ سلول در هر میلی‌لیتر تنظیم گردید در ادامه ۱۰۰µl از تیمول رقیق شده به صورت رقت‌های سریالی در هر گوده پخش می‌گردد به‌طوری‌که غلظت‌های تیمول از ۷۵۰ µg/µl تا ۱۷۵ متغیر بود. در ادامه ۱۰۰µl سوسپانسیون سلولی به تمام گوده‌ها اضافه گردید سپس در دمای ۳۵ سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه گردید. گوده کنترل مثبت حاوی محیط کشت RPMI و سوسپانسیون سلولی قارچ و کنترل منفی شامل دو گوده حاوی محیط کشت مایع و گوده دیگر محیط کشت RPMI به همراه تیمول در نظر گرفته شد.

نتایج کمترین غلظت ممانعت‌کننده تیمول (MIC) که برای جلوگیری از رشد قارچ مورد نیاز است، به صورت چشمی تعیین گردید. جهت تعیین کمترین غلظت کشنده قارچ (MFC) به میزان ۰/۱ میلی‌لیتر از محتویات گوده‌هایی که فاقد رشد قارچ بودند، در محیط سابورو دکستروز آگار استفاده گردید و پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۵ سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند.

تیمار جدایه‌ها در محیط کشت اختصاصی بیان ژن *nor1*

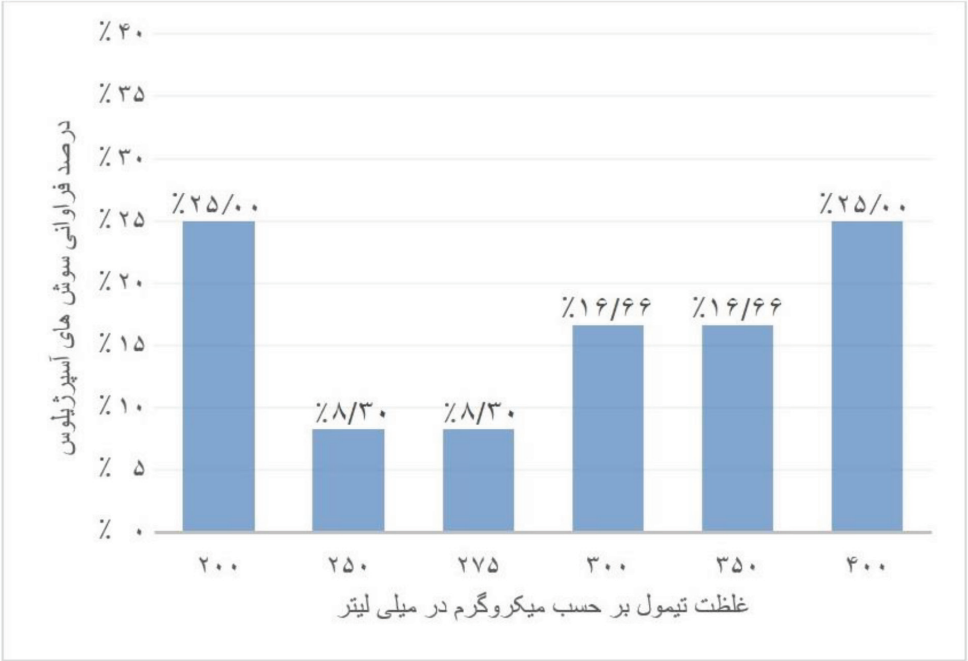
جهت بیان ژن *nor1* از محیط کشت پایه عصاره مخمر سوکروز آگار (YES Broth) حاوی ۲٪ عصاره مخمر و ۱۵٪ ساکاروز استفاده گردید. بدین منظور از ۰/۵ میلی‌لیتر ازسوسپانسیون کنیدیایی حاوی ۱۰۸ سلول بر میلی‌لیتر به ۵۰ میلی‌لیتر محیط YES حاوی ۲٪ عصاره مخمر و ۱۵٪ ساکاروز تلقیح گردید. سپس غلظت‌های تحت کمترین غلظت ممانعت‌کننده تیمول در دو جدایه حساس و مقاوم به تیمول به همراه نمونه کنترل که یک سوش استاندارد آسپرژیلوس فلاووس از نظر توکسین‌زایی بود، جهت ارزیابی میزان بیان ژن *nor1* بررسی گردید(۲۲). محیط‌های کشت تیمار شده در تاریکی به مدت ۷ روز و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و تحت شرایط ساکن گرمخانه‌گذاری شدند. بعد از گذشت یک هفته، توده قارچی (biomass) با استفاده از قیف بوخنر و کاغذ صافی استریل واتمن شماره یک که متصل به پمپ خلاء است، در شرایط استریل استخراج و بلافاصله در میکروتیوب‌های استریل ۱/۵ میلی‌لیتری استریل جمع‌آوری و در ازت مایع به سرعت منجمد و تا زمان استخراج RNA در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

استخراج RNA و آزمون PCR -(RT)

به منظور ارزیابی اثر تیمول بر بیان ژن *nor1*، استخراج RNA با استفاده از کیت (TRIzol)Termofisher company, USA از نمونه‌های تیمار شده با ماده موثره تیمول انجام پذیرفت و سپس در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. غلظت RNA استخراج شده کلیه نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۲۶۰ نانومتر قرائت شد و بعد از تعیین میزان OD، غلظت کلیه نمونه‌های RNA یکسان گردید. جهت خالص سازی و تصفیه RNA، حذف RNA از نمونه‌های RNA توسط آنزیم DNase I، طبق دستورالعمل کیت TRIzol)Termofisher company, USA) انجام گردید. جهت سنتز cDNA ازکیت FIREScript RT cDNA Synthesis KIT شرکت Solis BioDyne استفاده گردید. آزمون PCR -(RT) در حجم ۵۰ میکرولیتر انجام گردید که به ازای هر یک نمونه دو میکرولیتر cDNA به نسبت ۱/۲۰ رقیق شده، بافر ۱۰x به میزان پنج میکرولیتر، یک میکرولیتر dNTP ۱۰ mM، سه میکرولیتر MgCl۲ ۲۵ mM، یک و نیم میکرولیتر از هر پرایمر مورد مطالعه، نیم میکرولیتر Taq DNA Polymeras و سی و پنج و نیم میکرولیتر آب مقطر استریل در میکروتیوب ریخته شد و آزمون PCR -(RT) در ترموسایکلر به این صورت انجام گردید: دمای واسرشتی آغازین رشته‌های DNA ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۵ سیکل شامل: ۱ دقیقه مرحله واسرشت در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، مرحله اتصال در دمای ۶۱/۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله طویل‌سازی یا پلیمریزاسیون در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و مرحله طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گردید. پرایمرهای مورد استفاده جهت آزمون مولکولی برای ژن‌های *nor1* و ژن

جدول ۲- ترادف نوکلیوتیدی پرایمرهای مورد استفاده مربووط به ژن هدف *(nor1)* و ژن خانگی *(β-ACT1)*.

	توالی پرایمر	طول پرایمر (جفت باز)	پرایمر	
۲۸۱	۵'-CTACGCCATGCCGGGATAGA-۳'	۲۰	Forward	*Nor1*
	۵'-GGCATCAGTTTCCGAGTCGC-۳'	۲۴	Reverse	
۱۰۰	۵'-CGCTACGATCTTGATCTTCAT-۳'	۲۲	Forward	*β-ACT1*
	۵'-AGTTTCCTTGGTATGGAGTCT-۳'	۲۲	Reverse	



شکل۱- درصد فراوانی نتایج MIC تیمول در جدایه‌های آسپرژیلوس فلاووس بر حسب µg/ml. نتایج نشان داد میزان حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) برای نمونه ها بین µg/ml ۴۰۰ - ۲۰۰ متغیر بود.

شکل۲- درصد فراوانی نتایج MFC تیمول در جدایه‌های آسپرژیلوس فلاووس بر حسب µg/ml. میزان حداقل غلظت کشندگی (MFC) تیمول برای نمونه‌ها بین µg/ml ۴۵۰ - ۲۵۰ متغیر بود .

خانگی *β- actin* در جدول ۲ آمده است.

مراحل آزمون Real Time-PCR

انجام Quantitative Real-time PCR تکنیک بکار رفته در این تحقیق بوده که با این تکنیک میزان بیان mRNA ژن‌های مورد نظر با روش کمی نسبی و با استفاده از رنگ Eva Green ارزیابی گردید و میزان تکثیر در سیکل‌هایی که بیان ژن‌ها قابل ردیابی بود، تحت عنوان Threshold Ct (Cycle) نامیده و Ctهای حاصل نسبت به Ct مربوط به بیان ژن Actin۱ (Act1) مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از آزمون Real Time-PCR با استفاده از روش لیواک (Livak method) و محاسبه $۲^{-\Delta\Delta CT}$ برای بررسی تفاوت میزان بیان mRNA در گروه تیمار استفاده گردید و از ژن *ACT1* به عنوان ژن خانگی استفاده گردید. مقادیر Ct بدست آمده از نمونه‌های تیمار برای هریک از ژن‌های هدف و ژن خانگی به نرم‌افزار Excel وارد گردید و پس از بدست آوردن $۲^{-\Delta\Delta CT}$ تغییرات بیان این ژن‌ها نسبت به نمونه کنترل مورد ارزیابی قرار گرفت.

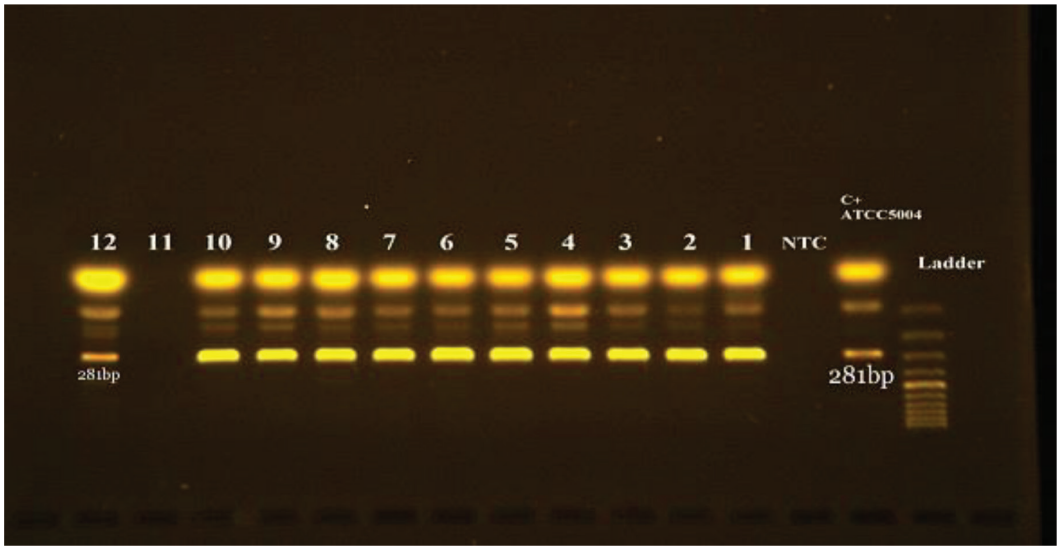
نتایج

جداسازی و شناسایی قارچ آسپرژیلوس فلاووس

پس از نمونه‌برداری، کشت و خالص‌سازی قارچها آزمایش ماکروسکوپی و میکروسکوپی بر روی جدایه‌های قارچی صورت پذیرفت. ظاهر ماکروسکوپی کلنی در هریک از جدایه‌ها بر روی محیط کشت توسط حاشیه سفید احاطه شده بود و پس از سه روز گرمخانه‌گذاری آسپرژیلوس فلاووس، کنیدی‌های سبز زیتونی تشکیل داد که بر روی ظاهر کلنی قابل مشاهده بود همچنین بر روی محیط پوتیتو دکستروز آگار قطرات بی رنگ تولید کردند. جدایه‌های قارچی رنگ‌آمیزی شده توسط لاکتو فنل کاتن بلو در زیر میکروسکوپ با مشاهده ساختارهای زایشی مورد شناسایی قرار گرفتند بدین صورت که قارچ دارای هایف با دیواره عرضی شفاف بوده و اسپورهای کونیدی از فیالایدهای روی وزیکول که بر انتهای کونیدیوفور قرار گرفته تولید شدند. ظاهر وزیکول کروی شکل مشاهده شد. همچنین کونیدیوفور بی‌رنگ و فاقد دیواره عرضی بوده که در جدار کونیدیوفور خارهای ریزی وجود داشت. نحوه قرارگیری سلول‌های کونیدی‌زا بر روی تمام سطح وزیکول مشاهده گردید.

تعیین نتایج آزمون فعالیت ضدقارچی تیمول بر روی آسپرژیلوس فلاووس

در این مطالعه اثر ضدقارچی تیمول بر ۱۲ جدایه مختلف قارچ آسپرژیلوس فلاووس مورد آزمون قرار گرفت. نتایج آزمون میکرودایلوشن براث به منظور تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی تیمول (MIC) نشان داد که حساسیت جدایه‌های مختلف در برابر تیمول متفاوت بود به این صورت که میزان حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MFC) تیمول برای نمونه‌ها به ترتیب بین ۴۰۰ µg/ml – ۲۰۰ و µg/ ml ۴۵۰ - ۲۵۰ متغیر بود. بیشینه حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) جدایه‌ها، در غلظت‌های ۲۰۰ µg/ml و ۴۰۰ µg/ml و کمینه MIC، در غلظت‌های ۲۵۰ µg/ml و ۲۷۵ µg/ml مشاهده گردید (شکل۱). همچنین بیشینه MFC نمونه‌ها در غلظت‌های ۴۵۰ µg/ml و ۲۵۰ µg/ml و کمینه MFC در غلظت‌های ۳۰۰ µg/ml، ۳۲۵ µg/ml و ۴۰۰ µg/ml مشاهده

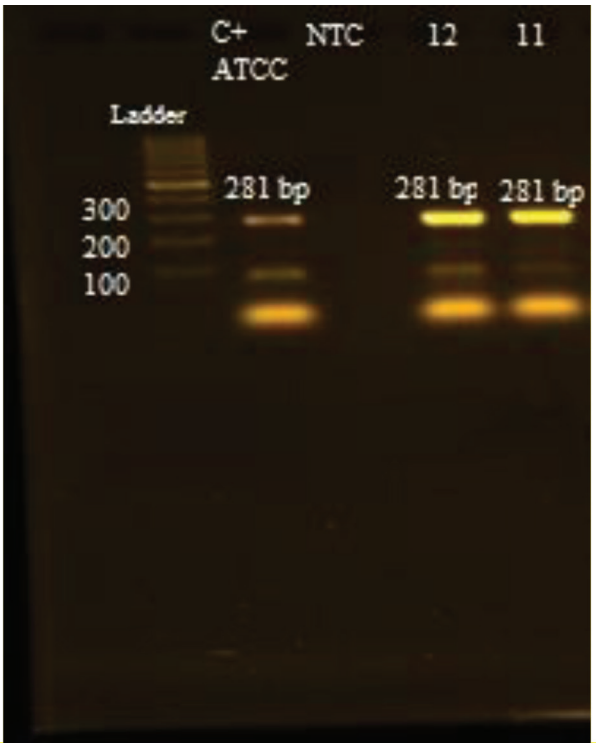


شکل۳- محصول بیان ژن در واکنش زنجیره ایی پلیمراز RT-PCR , برای نمونه های قارچی تیمار شده با تیمول ۲۸۱bp می‌باشد (چاهک‌های ژل از سمت راست به ترتیب: لدر، نمونه استاندارد، کنترل منفی، نمونه‌های تحت تیمار تیمول شماره ۱ تا ۱۲) در نمونه‌های شماره یک تا ده باندها بر روی ژل قابل مشاهده می‌باشند در صورتی که در نمونه شماره ۱۱ باندی مشاهده نگردید که بعنوان سوش حساس به تیمول در نظر گرفته شد. نمونه شماره ۱۲ باند ضعیف نسبت به سایر جدایه‌ها مشاهده گردید که نسبت به سوش شماره ۱۱ بعنوان سوش مقاوم در نظر گرفته شد.

گردید (شکل ۲).

اثر تیمول بر بیان ژن *nor1* در جدایه‌های قارچ آسپرژیلوس فلاووس

در مطالعه حاضر نتایج آزمون بیان ژن در واکنش زنجیره‌ایی پلیمراز (RT- PCR) نشان دهنده بیان ژن *nor1* در مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین بود که جهت تعیین حضور ژن *nor1* در جدایه‌های مختلف قارچ آسپرژیلوس فلاووس ابتدا در حضور پرایمرهای ژن مربوطه آزمون (RT- PCR) انجام گرفت. پس از تیمار جدایه‌های مختلف قارچ آسپرزیلوس فلاووس در حضور تیمول، بیان ژن *nor1* در تمام جدایه‌ها به غیر از نمونه شماره ۱۱ مشاهده گردید که حاکی از عدم بیان ژن *nor1* در حضور تیمول بود. بعلاوه باند ضعیف مشاهده شده بر روی ژل در نمونه شماره ۱۲ در مقایسه با سایر نمونه‌های تیمار شده نشان‌دهنده کاهش بیان ژن جدایه مذکور در حضور تیمول بود چنانچه در سایر نمونه‌ها باند قوی در حضور تیمول مشاهده گردید(شکل ۳). از آن‌جایی که دو نمونه شماره یازده و دوازده تحت تیمار با تیمول جهت انجام واکنش Real-Time PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند و محصول RT-PCR حاکی از عدم بیان ژن *nor1* در نمونه شماره یازده بود و نیز بیان ژن مذکور در نمونه شماره دوازده نسبت به سایر نمونه‌ها به لحاظ کیفی ضعیف‌تر و در مقایسه با سوش یازده قوی‌تر بود، بدین منظور جهت اطمینان از بیان ژن هدف در جدایه‌های یازده و دوازده قبل از تیمار یک واکنش RT-PCR انجام گردید



شکل۴- محصول RT-PCR در دو نمونه یازده و دوازده قبل از تیمار که جهت انجام آزمون کمی Real-Time PCR مورد بررسی قرار گرفتند. محصول RT-PCR در ۲۸۱bp مشاهده گردید.

که بیان ژن مذکور را در هر دو نمونه مشاهده گردید(شکل۴).

در مرحله بعد، از آزمون Real-Time PCR برای نمونه‌های ۱۱، ۱۲ استفاده گردید. همچنین به منظور ارزیابی بهینه بودن شرایط آزمون از یک ژن رفرنس یا خانگی، بتا اکتین (*β-Actin*) استفاده شد. نمودار تکثیر ژن رفرنس در آزمون مولکولی بیان ژن به روش کمی Real-Time PCR برحسب سیکل نشان داد که بیان این ژن در نمونه‌ها متفاوت بوده و سیکل آستانه (ct) آن در حضور تیمول برای نمونه کنترل مثبت (ATCC)، ۱۱ و ۱۲ به ترتیب ۳۲، ۳۶ و ۳۲ بوده است. نمودار تکثیر ژن *nor1* در نمونه کنترل مثبت (ATCC)، ۱۱ و ۱۲ سیکل آستانه (ct) به ترتیب ۳۵، ۳۴ و ۳۵ بوده است. واکنش Real-Time PCR به صورت سه بار تکرار برای نمونه کنترل مثبت (ATCC)، نمونه ۱۱ و نمونه ۱۲ انجام گردید نتایج مربوط به هر دو ژن رفرانس و هدف در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که تیمول باعث کاهش بیان ژن مورد نظر در سوش حساس (۱۱) شده در حالی‌که میزان بیان ژن در سوش مقاوم (۱۲) بالاتر از سوش کنترل (ATCC) محاسبه گردید. میزان بیان ژن مورد نظر در هر یک از جدایه‌های شماره ۱۱ و ۱۲ به ترتیب ۰/۰۶ و ۱/۶۹ درصد محاسبه گردید (نمودار۳). (با توجه به آنکه از بین ۱۲ جدایه آسپرژیلوس فلاووس تنها دو سوش مقاوم و حساس به تیمول جهت بیان ژن *nor1* مورد ارزیابی قرار گرفت بیان نسبی ژن مدنظر در گروه‌ها از نظر آماری مقایسه نشد).

بحث

در تحقیق حاضر ابتدا جدایه‌های قارچی آسپرژیلوس فلاووس از نمونه‌های مختلف خشکبار نظیر دانه‌های روغنی جدا گردید و سپس جهت ارزیابی فعالیت ضدقارچی تیمول، غلظت‌های مختلفی از ۷۵۰ تا ۱۷۵ میکرولیتر در هر میلی‌لیتر در اتانول به عنوان حلال تهیه گردید. در ادامه حساسیت جدایه‌های مختلف آسپرژیلوس فلاووس تحت تیمار با عصاره تیمول در محیط مایع طبق دستورالعمل استاندارد CLSI و به روش M38-A2 ارزیابی گردید. همچنین تاثیر تیمول بر روی بیان ژن *nor1* در جدایه‌های قارچ آسپرژیلوس فلاووس در دو سوش با حساسیت‌های مختلف با روش Real-Time PCR موردارزیابی قرار گرفت.

خاصیت ضدمیکروبی فرآورده‌های میکروبی اسانس‌های گیاهی از قدیم مورد توجه بوده است. بسیاری از گیاهانی که در طبیعت وجود دارند به صورت طبیعی حاوی ترکیبات ضدقارچی و ضدمیکروبی فراوانی هستند که می‌توانند از رشد قارچ جلوگیری کرده و از تولید آفلاتوکسین و بیماری‌های حاصله از آن‌ها جلوگیری کنند. از جمله این گیاهان می‌توان به تیره نعنائیان، چتریان و شاه‌پسند اشاره نمود که دارای ترکیبات طبیعی مثل تیمول و ایزومرهای آن کارواکرول و دیگر ترکیبات طبیعی مثل اوژنول هستند(۱۲, ۱۳).

تیمول یک ترکیب فنلی‌منوترپنوئید فرار طبیعی است که ماده اصلی فعال در عصاره روغنی استخراج شده از آویشن شیرازی، ریحان آفریقایی، پونه کوهی، زنیان و بسیاری از گیاهان دیگر می‌باشد. این ماده یک مولکول همه‌کاره با کاربردهای عملی بسیار متنوعی مانند پزشکی، دندانپزشکی، دامپزشکی، مواد غذایی و مواد شیمیایی و غیره است. همچنین کاربردهای دارویی آن نیز مورد بررسی و گزارش قرار گرفته است، که تمرکز آن بر فعالیت‌های برجسته ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی

می‌باشد. علاوه بر این، قابل توجه است که تحقیقات بسیاری در مورد کاربردهای کشاورزی آن افزایش یافته است، و استفاده از آن را به عنوان یک ماده شیمیایی طبیعی و نگهدارنده برای حفاظت از مواد غذایی در برابر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در طی کاشت و ذخیره‌سازی برجسته می‌کند، که می‌تواند تأثیر مفیدی بر سلامتی انسان و محیط زیست داشته باشد. تیمول همچنین بعنوان یک ترکیب اکسایشی فعال باعث ایجاد گونه‌های فعال اکسیژن و پراکسیداسیون چربی در سلول‌های قارچی می‌گردد و باعث اختلال در دیواره سلولی می‌گردد و این تاثیر ناشی از اتصال گروه هیدروکسیل تیمول به غشای اسپور و هیف بوده که موجب پراکسیداسیون لیپید که در بیوسنتز ارگوسترول سلول‌های قارچی نقش دارد می‌شود. از نظر بیوفیزیکی رفتار تیمول آمفیپاتیک است، که نشان می‌دهد می‌تواند بر ساختار غشای سلولی و الکترواستاتیک سطحی تاثیر بگذارد و در نتیجه کشش نامتقارن ایجاد کند و با افزایش سیالیت غشایی و تغییر در نفوذپذیری غشا باعث تغییر در خواص و عملکرد غشا می‌گردد (۱۱و ۱۶).

امروزه با توجه به اثرات جانبی و سرطان‌زایی بسیاری از ترکیبات شیمیایی و ضدمیکروبی تمایل به استفاده از ترکیبات طبیعی مانند اسانس‌های گیاهی و مشتقات آن‌ها افزایش یافته است و تحقیق در زمینه ارزیابی اثر ضدقارچی ترکیبات طبیعی مختلف همچنان ادامه دارد. علاوه بر اثر مهارکنندگی ترکیبات طبیعی بر رشد قارچ‌ها، تاثیر آنها بر میزان بیان ژن‌هایی که در مسیر بیوسنتز توکسین‌ها نقش دارند به خصوص آفلاتوکسین‌ها اهمیّت به‌سزایی دارد(۱۴). از این رو در این تحقیق فعالیت ضدقارچی تیمول بر روی جدایه‌های آسپرژیلوس فلاووس و نیز تاثیر آن بر بیان ژن *nor1* در جدایه‌های تیمار شده مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعات بسیاری تاکنون فعالیت بازداری اسانس‌های گیاهی مختلف در برابر بسیاری از قارچ‌های مولد آفلاتوکسین مانند سویه‌های مختلف آسپرژیلوس گزارش شده است و فعالیت ضدقارچی اسانس‌ها بسته به نوع و غلظت اسانس و نوع قارچ عامل فساد مورد مطالعه، متفاوت بوده است. در مطالعه حاضر فعالیت ضدقارچی تیمول نسبت به تمام جدایه‌های آسپرژیلوس فلاووس نشان داده شد. هیتوکوتا و همکاران در سال ۱۹۸۰ گزارش نمودند که تیمول استخراج شده از آویشن در غلظت ۰/۴ mg/ml از رشد کپک‌های آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس ورسیکالر ممانعت به عمل آوردند(۱۵). همچنین در مطالعه دیگری اسانس‌های مختلف آویشن که عمدتاً حاوی تیمول بودند نیز اثر بازدارندگی خوبی در برابر رشد دو قارچ آسپرزیلوس فلاووس و آسپرژیوس پارازیتیکوس شان دادند(۱۶). که نتایج تحقیقات ما با این مطالعات هم‌خوانی داشت. علاوه بر این عباس‌زاده و همکاران در سال ۲۰۱۴ در مطالعه‌ای فعالیّت ضدقارچی ترکیبات ضدقارچ مختلفی از جمله تیمول در برابر مهم‌ترین قارچ‌های عامل فساد مواد غذایی را مورد بررسی قرار دادند. به طوری‌که حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی تیمول در برابر یک سویه آسپرژیلوس فلاووس به ترتیب ۲۰۰ µg/µl و ۲۵۰ محاسبه گردید(۱۲) همچنین نتایج مطالعه یحیی رعیت و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان داد که ترکیب اصلی اسانس آویشن شیرازی را کارواکرول و تیمول تشکیل می‌دهند، همچنین با افزایش غلظت اسانس رشد کپک آسپرزیلوس پارازیتیکوس و تولید آفلاتوکسین کاهش یافت به طوری‌که حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس آویشن شیرازی در برابر قارچ آسپرژیلوس پارازیتیکوس را ۲۰۰ ppm و حداقل غلظت کشندگی آن را ۴۰۰ ppm گزارش کردند(۱۷). در تحقیق حاضر میزان MIC و MFC تیمول برای نمونه‌ها به ترتیب بین ۲۰۰ µg/ml و ۴۰۰ µg/ml متغیر بود که نتایج این تحقیقات نیز با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد. به طور کلی تفاوت اثر اسانس‌ها و ترکیبات ضدقارچی مختلف را می‌توان به اختلاف در نوع و ساختار ترکیبات شیمیایی موثر آن‌ها نسبت داد. طبق

جدول ۳- داده‌های مرتبط با تعیین بیان نسبی ژن nor۱ و β-ACT۱ در جدایه‌های آسپرژیلوس فلاووس: سوش کنترل، حساس و مقاوم متعاقب مواجه با غلظت تحت MIC تیمول با استفاده از آزمون Real-Time PCR.

Aspergillus flavus	گروه	میانگین CT	میانگین CT	ΔCT	ΔΔCT	RFCΨ
		Nor۱†	β-ACT ¥			
۵۰۰۴ ATCC	کنترل	۳۵/۲۲	۳۲/۶۹	۲/۵۳		۱
جدایه (۱۱) حساس						۱
	تیمار	۳۴/۶۸	۳۶/۰۸	-۱/۲۹	-۳/۹۳	۱۵/۲۴
جدایه (۱۲) مقاوم						۱
	تیمار	۳۵/۸۴	۳۲/۵۴	۳/۲۹	۰/۷۵	۰/۵۹

*CT: Threshold cycle: به سیکلی که در آن خط Threshold منحنی PCR را قطع می‌کند Threshold cycle می‌گویند.

†Nor1: norexon 1 gene - ¥β-ACT: β-Actin (Housekeeping gene)

ΨRFC: Relative Fold Change: میزان تغییر نسبی بیان ژن.

تحقیقات انجام شده ۲۵ ژن دخیل در مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین‌ها در ژنوم آسپرزیلوس فلاووس و آسپرزیلوس پارازیتیکوس شناسایی شده‌اند که مهّم‌ترین آن‌ها شامل *aflR, aflD, aflO ,1-omt-A, nor ,1-ver* و *aflP* می‌باشند(۱۸). به علاوه پاسون و همکاران در سال ۲۰۱۰ بیان داشتند که بین جمعیت گونه‌های مختلف قارچ آسپریلوس در محصولات کشاورزی و بیان ژن *nor1* همبستگی وجود دارد(۱۹). در تحقیقات انجام شده بر روی ژن *nor1* در آسپرژیلوس پارازیتیکوس به عنوان اوّلین ژن کلون شده در مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین، نشان داد که حذف این ژن باعث کاهش تولید آفلاتوکسین می‌گردد ولی تولید آن را به طور کامل متوقف نمی‌کند(۲۰). این موضوع را می‌توان به حضور و بیان سایر ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین مانند *aflR* و *aflQ* در قارچ آسپرژیلوس فلاووس نسبت داد(۲۱). برخی مطالعات فعالیت ضدقارچی فرآورده‌های طبیعی مانند زردچوبه و زنجبیل را بررسی کردند که نتایج با کاهش تولید آفلاتوکسین از طریق کاهش بیان برخی ژن‌های ساختاری و بیان متفاوت ژن‌های دخیل در بیوسنتز آفلاتوکسین از نظر کیفی با روش RT-qPCR بود (۲۲, ۲۳). در این مطالعه ۲ نمونه از بین ۱۲ نمونه قارچی بر حسب حساسیت و مقاومت به تیمول انتخاب شد و بیان یکی از ژن‌های مهم در مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین تحت آزمون Real Time-PCR ارزیابی شد، که در نمونه ۱۱ کاهش بیان ژن تحت تاثیر تیمول مشاهده گردید در حالی‌که در نمونه ۱۲ میزان بیان ژن نسبت به نمونه کنترل بیشتر تعیین گردید. با توجه به دخیل بودن ژن‌های مختلف در مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین، تاثیر تیمول بر بیان سایر ژن‌ها نیز در مطالعات آینده باید مورد ارزیابی قرار گیرد تا زمینه استفاده ایمن و مطمئن ترکیبات ضدقارچی طبیعی مانند اسانس‌های گیاهی در کاهش آلودگی‌های محصولات غذایی و کشاورزی فراهم آید. همچنین مطالعات بیشتری در زمینه تاثیر تیمول با سایر ترکیبات طبیعی ضدقارچی و ضدمیکروبی جهت اثربخشی بهتر بر روی مهارکنندگی و کشندگی قارچ باید انجام پذیرد.

منابع مورد استفاده

1. Abbaszadeh S, Sharifzadeh A, Shokri H, Khosravi A, Abbaszadeh A .2014 . .Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. *Journal de mycologie medicale.*2 4(2):e51-e56.

2. Ahmad A, Khan A, Akhtar F, Yousuf S, Xess I, Khan L, et al.2011 .Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against Candida. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* .30(1):41-50.

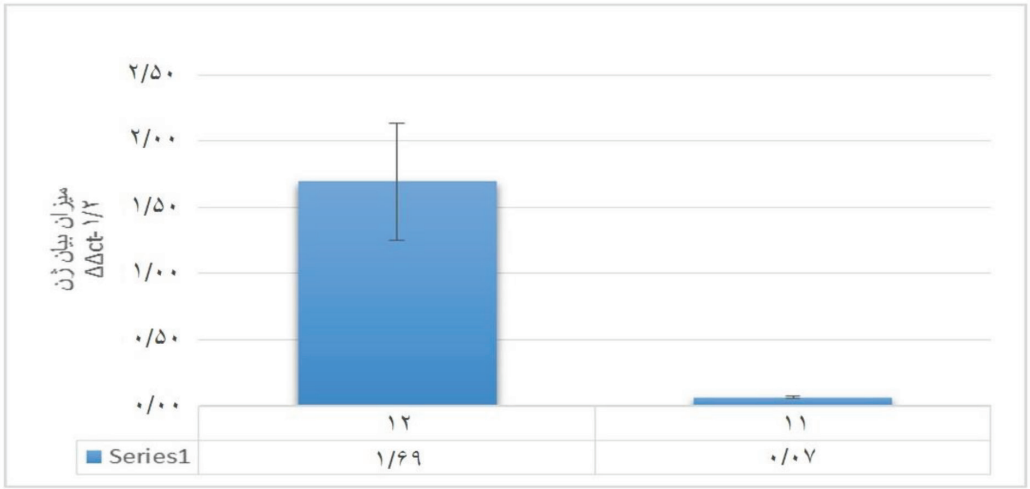
3. Alizadeh-Salteh S. 2015 Growth inhibition of Aspergillus flavus isolated from pistachio by secondary metabolites. *Journal of Nuts* 6(2):85-94.

4. J.IPitt, J. C Basilico,M. L. Abarca,c. Lopez. 2000 . Mycotoxin and toxigenic fungi. *Medical mycology*.38: 41-46.

5. Bishop CD. .1995Antiviral activity of the essential oil of Melaleuca alternifolia (maiden amp; Betche) Cheel (tea tree) against tobacco mosaic virus. Journal of Essential Oil Research. 7(6):641-4.

6. Bryden WL. .2007Mycotoxins in the food chain: human health implications. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*.16(S1):95-101.

7. Hitokoto H, Morozumi S, Wauke T, Sakai S, Kurata H.. 1980



شکل ۵ - میزان بیان ژن *nor1* در مقایسه با گروه کنترل مثبت (ATCC) در نمونه‌های شماره ۱۱ و ۱۲.

Inhibitory effects of spices on growth and toxin production of toxigenic fungi. *Applied and Environmental Microbiology*. 39(4):818-22.

8. Hu Y, Zhang J, Kong W, Zhao G, Yang M. .2017 Mechanisms of antifungal and anti-aflatoxigenic properties of essential oil derived from turmeric (Curcuma longa L.) on Aspergillus flavus. *Food chemistry*. 220:1-8.

9. López-Malo A, Alzamora SM, Palou E. .2002 Aspergillus flavus dose–response curves to selected natural and synthetic antimicrobials. *International Journal of Food Microbiology*. 73(2-3):213-8.

10. López-Malo A, Alzamora SM, Palou E. .2005Aspergillus flavus growth in the presence of chemical preservatives and naturally occurring antimicrobial compounds. *International Journal of Food Microbiology*. 99(2):119-28.

11. L Shcherbakova, O Mikityuk, L Arslanova.2021. Studing the ability of Thymol to Improve fungicidal effects of Tebuconazole and Difenoconazole Against some plant pathogenic fungi in seed or foliar treatment. *Frontiers in Microbiology*.12,331

12. Mari M, Bertolini P, Pratella G.2003. Nonconventional methods for the control of post□harvest pear diseases. *Journal of Applied Microbiology*. 94(5):761-6

13. Moon Y-S, Lee H-S, Lee S-E. . 2018Inhibitory effects of three monoterpenes from ginger essential oil on growth and aflatoxin production of Aspergillus flavus and their gene regulation in aflatoxin biosynthesis. *Applied Biological Chemistry*. 61(2):243-50.

14. Organization WHO. Food safety and foodborne illness. WHO fact sheet No. 237.

15. Passone MA, Rosso LC, Ciancio A, Etcheverry M. . 2010Detection and quantification of Aspergillus section Flavi spp. in stored peanuts by real-time PCR of nor-1 gene, and effects of storage conditions on aflatoxin production. *International journal of food microbiology*.138(3):276-81.

16. Pessoa L, Morais S, Bevilaqua C, Luciano J. .2002Anthelmintic activity of essential oil of Ocimum gratissimum Linn and eugenol against Haemonchus contortus. *Veterinary parasitology*.109(1-2):59-63.

17. P C Braga, M Alfieri, M Culici. 2007. Inhibitory activity of thymol against the formation and viability of candida albicans hyphae. *Mycoses*.50 :502-506

18. Rasooli I, Abyaneh MR. .2004Inhibitory effects of Thyme oils on growth and aflatoxin production by Aspergillus parasiticus. *Food control*.15(6):479-83.

19. Scherm B, Palomba M, Serra D, Marcello A, Migheli Q. .2005Detection of transcripts of the aflatoxin genes aflD, aflO, and aflP by reverse transcription–polymerase chain reaction allows differentiation of aflatoxin-producing and non-producing isolates of Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus. *International journal of food microbiology*.98(2):201-10.

20. Skory CD, Chang P-K, Linz JE. .1993Regulated expression of the nor-1 and ver-1 genes associated with aflatoxin biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*.59(5):1642-6.

21. Tripathi P, Dubey N. . 2004 Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest biology and Technology*.32(3):235-45.

22. Yahyaraeyat R, Khosravi A, Shahbazzadeh D, Khalaj. .2013The 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*.44(2):649-55.

23. Yu J, Chang P-K, Ehrlich KC, Cary JW, Bhatnagar D, Cleveland TE, et al. .2004Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. Applied andEnvironmental Microbiology.70(3):1253-62.

Zain ME..2011 Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*. 15(2):129-44.