مقاله تحقیقی

کنترل قارچ آسپرژیلوس و آفلاتوکسین حاصل ازآن با استفاده از مواد مؤثره گیاهی

سوده کریمی[۱]، جلال غلام‌نژاد[۲]، مژده ملکی[۱]

۱-گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، تهران، ایران
۲-گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اردکان، اردکان، ایران
نویسنده مسئول: جلال غلام نژاد، ایمیل: jgholamnezhad@ardakan.ac.ir

تاریخ دریافت:۹۹/۰۹/۰۴ ۸(۱) ۱۱۷-۱۳۶ تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۱/۲۷

چکیده

پسته یک محصول مهم صادراتی در ایران است. این محصول همواره به‌وسیلهٔ قارچ بیمارگر *Aspergillus flavus* و آفلاتوکسین ناشی از آن تهدید می‌شود. در حال حاضر محققین به دنبال استفاده از روش‌های بی‌خطر جایگزین، به جای استفاده از سایر روش‌های کنترل بیماری‌های گیاهی مانند استفاده از سموم شیمیایی، هستند. عصاره‌های گیاهی به‌صورت یک روش دوست‌دار محیط زیست، می‌تواند برای کنترل *A. flavus* استفاده شود. در این مطالعه تأثیر عصاره‌های گیاهی شامل اندام هوایی اسطوخودوس فرانسوی (*Lavandula stoechas*)، آویشن شیرازی (*Thymus vuldaris*)، بذر رازیانه (*Foeniculum vulgare*)، اندام هوایی مرزه (*Satureja hortensis*) روی میزان تولید و هم‌چنین خاصیت تجزیه‌کنندگی آفلاتوکسین تولیدی، به‌وسیلهٔ روش‌های دیسک کاغذی و اختلاط عصاره با محیط کشت و نیز روی پسته مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد استفاده از غلظت ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصارهٔ متانولی اسطوخودوس به میزان ۶۵/۶۳ درصد از رشد قارچ بیمارگر کاست. در آزمون استفاده از عصاره‌ها روی دیسک کاغذی و هم‌چنین اختلاط عصاره‌ها با محیط کشت، عصارهٔ آبی اسطوخودوس با غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، به‌ترتیب با ۳۹/۳۱ و ۵۵/۹۶ درصد ممانعت از قارچ و عصارهٔ آویشن شیرازی با غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌ترتیب با ۲۹/۵۳ و ۳۹/۵۴ درصد ممانعت از قارچ، مؤثرترین عصاره‌ها بودند. زمانی‌که عصاره‌ها به طور مستقیم روی قارچ تولیدکنندهٔ آفلاتوکسین به‌کار گرفته شدند، نتایج نشان داد که غلظت ۴۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسطوخودوس به‌میزان ۹۱/۱۸ درصد از تولید آفلاتوکسین کل در محیط کشت جلوگیری به‌عمل آورد. در نهایت عصارهٔ آبی اسطوخودوس در غلظت ۴۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر بیشترین تأثیر را (۷۶/۹۵ درصد) نسبت به شاهد در کاهش میزان اسپور تولیدی به‌وسیلهٔ قارچ بیمارگر روی میوهٔ پسته نشان داد. نتایج میزان آفلاتوکسین موجود در پسته‌ها نشان داد که هر دو گیاه مورد مطالعه (اسطوخودوس و آویشن شیرازی) در غلظت‌های ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر باعث کاهش معنی‌دار میزان آفلاتوکسین B1 تولیدی شدند. نظر به تأثیر بسیار خوب عصاره‌های گیاهی مورد مطالعه در این تحقیق در آزمایشگاه و هم‌چنین روی پسته، به‌خصوص اسطوخودوس و آویشن شیرازی به‌عنوان ترکیبات با اثرات قارچ‌کشی بالا و دوستدار محیط زیست شناخته شدند.

واژه‌های کلیدی: پسته، *Aspergillus flavus*، آفلاتوکسین، عصاره گیاهی

مقدمه

پسته مقام دوم صادرات غیر نفتی کشور ایران را به خود اختصاص داده است که برای حفظ موقعیت کشور در بازار جهانی از نظر صادرات و حفظ ویژگی‌های ایمنی و سلامت آن باید تلاش بیشتری صورت گیرد (Fani *et al*., 2015). پسته یک محصول مهم صادراتی در برخی کشورها به‌ویژه ایران است و در بین محصولات کشاورزی با بالاترین خطر آلودگی به آفلاتوکسین قرار دارد. آفلاتوکسین B1 بیشترین پتانسیل سرطان‌زایی را در بین آفلاتوکسین‌ها دارد (Wu & Zou, 2009).

در سال‌های اخیر گرایش زیادی به استفاده از پتانسیل بالقوه مواد بیولوژیکی و هم‌چنین مواد با منشأ طبیعی در کنترل حشرات، بیماری‌ها وعلف‌های هرز ایجاد شده است. استفاده از عصاره و اسانس‌های گیاهی یکی از موارد جایگزینی است که استفاده از آن همواره مدنظر محققین این رشته بوده است (Gholamnejad *et al*., 2009).

خاصیت تجزیه‌پذیری عصاره‌های گیاهی در طبیعت و سمیت پایین عصاره‌های گیاهان دارویی برای انسان و سایر پستانداران و هم‌چنین اثرات مخرب کمتر آن‌ها بر محیط‌زیست، این ترکیبات را به‌عنوان ترکیبات جایگزین سموم شیمیایی مطرح کرده است. برخی عصاره‌های گیاهی با داشتن مواد و عناصر غذایی در افزایش رشد گیاه مفید بوده و برای انسان و محیط زیست بی‌خطر هستند (Bakkali *et al*., 2008; Nikam *et al*., 2007). در تحقیقات متعددی اثرات ضدقارچی عصاره گیاهانی مانند اسطوخودوس و آویشن شیرازی به اثبات رسیده است (Beiko *et al*., 2008; Nasrin *et al*., 2018). در تحقیقی اثرات بازدارندگی عصاره‌های اِن هگزانی،کلروفرمی، دی‌اتیل‌اتری و اتانولی هفت گونهٔ گیاهی علیه دو قارچ بیماری‌زای گیاهی مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج نشان داد فاز هگزانی عصاره‌های گیاه آویشن کوهی و پونه موثرترین عصاره‌ها علیه هر دو بیمارگر عمل کردند (Beiko *et al*., 2008; Górnaa *et al*., 2017).

آفلاتوکسین B1 به‌عنوان یکی از عوامل ایجادکنندهٔ سرطان و هم‌چنین ایجاد کبد چرب می‌باشد، لذا جنبه‌های مختلف موضوع آلودگی پسته به این قارچ باید به‌طور جدی مطالعه و بررسی شود (Mahmoudi *et al*., 2014).

عصاره‌های گیاهی پتانسیل مبارزه با قارچ عامل تولید آفلاتوکسین را دارند و می‌توانند با کم کردن رشد قارچ و یا از بین بردن آن، تولید آفلاتوکسین را کاهش دهند (Kamaluldeen *et al*., 2014).

استفاده از عصاره‌های گیاهی می‌تواند به‌صورت یک روش دوستدار محیط‌زیست سبب جلوگیری از اثرات مضر بر محیط‌زیست شود (Bakkali *et al*., 2008; Kalem *et al*., 2017). عصاره‌های گیاهی ترکیباتی هستند که منشأ طبیعی داشته و به‌همین سبب هیچ نوع خطری برای محیط زیست و سلامت انسان ندارد و تا به حال هیچ‌نوع مقاومتی علیه آن‌ها گزارش نشده است (Gholamnezhad *et al*., 2014; Temba *et al*., 2016).

نظر به اهمیت قارچ *A. flavus* در تولید توکسین روی پسته و لزوم کم کردن و از بین بردن این توکسین به روش‌های بی‌خطر برای محیط زیست، در این مطالعه تأثیر عصاره‌های گیاهی مختلف روی کاهش میزان تولید آفلاتوکسین تولید شده در شرایط آزمایشگاه و هم روی میوهٔ پسته، مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

جدایهٔ قارچی

ایزولهٔ قارچ *Aspergillus flavus* IR6 از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. از ایزوله‌های قارچی با استفاده از آب مقطر استریل، سوسپانسیون تهیه شد و این سوسپانسیون زیر هود و در شرایط کاملاً استریل روی محیط کشت آب-آگار کشت شدند. تک اسپور های جوانه‌زده بعد از ۱۲ الی ۱۸ ساعت به تشتک پتری و لوله‌های آزمایش حاوی محیط شیب دار PDA منتقل شدند. کشت‌های درون لوله و پتری بعد از چهار الی پنج روز رشد در محیط انکوباتور، به داخل یخچال با دمای ۴ درجه

سلسیوس جهت تثبیت و استفاده از کشت مجدد آن‌ها برای انجام آزمایش منتقل شدند (Yonemura *et al*., 2007).

تهیهٔ عصاره‌های گیاهی

در این تحقیق، از اندام هوایی اسطوخودوس فرانسوی (*Lavandula stoechas*)، بذر رازیانه (*Foeniculum vulgare*)، اندام‌هوایی مرزه (*Satureja hortensis*)، و اندام هوایی آویشن‌شیرازی (*Thymus vulgaris*) استفاده شد. این گیاهان ابتدا شستشوی سطحی شده و سپس با هیپوکلریت سدیم ۲درصد به مدت ۵ دقیقه ضدعفونی و در مرحلهٔ بعد با آب مقطر استریل سه مرتبه شسته شدند (Alam *et al*., 2014). نمونه‌های گیاهی در شرایط آزمایشگاه و دور از تابش مستقیم نور آفتاب خشک شدند. اندام‌های هوایی به‌وسیلهٔ خردکن پودر شده و از الک یک مش عبور داده شدند (Abdul Aziz *et al*., 2010).

عصاره‌گیری به‌منظور تعیین بهترین فاز استخراج با دو حلال متانول و آب به روش خیساندن انجام گرفت. برای تهیه عصاره از گیاه، ۳۰ گرم از پودر اندام هوایی خشک شده را با نسبت ۱ به ۱۰ (گیاه به حلال) در ارلن ۱۰۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۳۰۰ میلی‌لیتر حلال در دمای ۳۵ درجه سلسیوس مخلوط کرده و به مدت ۳ ساعت روی شیکر دورانی با سرعت ۱۳۰ دور در دقیقه در شرایط تاریکی قرارگرفت. این عمل سه مرتبه تکرار شد و هر بار به مدت سه ساعت انجام شد. عصاره‌های متانول و آب از فیلترهای کاغذی ۰/۴۵ میکرون به کمک پمپ خلا عبور داده شدند. حلال متانول موجود در هر عصاره توسط دستگاه روتاری در دمای ۴۵ درجه سلسیوس تبخیر شد. باقیمانده حلال آب نیز به کمک دستگاه فریزدرایر به مدت ۲۴ ساعت جدا شد. در نهایت ماده خشک حاصل در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد (Gholamnezhad *et al*., 2019).

بررسی تأثیر عصاره در جلوگیری از رشد میسلیومی قارچ و تولید آفلاتوکسین

در این آزمایش از هر عصاره خشک شده مقادیر ۱۲/۵ ، ۲۵ ،۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم پودر خشک شده در یک میلی لیتر حلال دیمتیل سولفوکسید (DMSO) به‌عنوان حلال مناسب حل شد. سپس یک میلی‌لیتر DMSO حاوی عصاره به ۴۸ میلی‌لیتر محیط کشت مایع PDB درون فلاکس‌های ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری اضافه شد تا غلظت‌های ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میلی‌گرم عصاره در لیتر محیط کشت تهیه شود. در مورد شاهد نیز از DMSO به تنهایی داخل محیط کشت استفاده شد. سپس بلافاصله یک میلی‌لیتر سوسپانسیون ۱×۱۰^{۵} اسپور قارچ در میلی‌لیتر به محیط مایع درون ارلن اضافه شد و به‌مدت هفت روز در شیکر انکوباتور با دور ۱۰۰ دور در دقیقه، دمای ۳۰ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی نگهداری شدند. توده‌های میسلیومی به کمک کاغذ صافی واتمن از محیط کشت جدا شد و در آون در دمای ۷۰ درجه سلسیوس خشک شدند. سپس وزن خشک میسیلیوم محاسبه شد. در نهایت میزان آفلاتوکسین B1 موجود استخراج و مقدار آن با استفاده از روش کروماتوگرافی لایهٔ نازک با کارایی بالا (HPTLC) تعیین گردید (Gorran *et al*., 2013). میزان بازداری از تولید آفلاتوکسین B1 در تیمارهای مختلف با استفاده از نسبت میزان توکسین تولیدشده در تیمارها به میزان توکسین تولیدشده در شاهد و کاستن آن از عدد ۱ محاسبه شد (Gorran *et al*., 2013).

تأثیر عصاره‌های گیاهی بر رشد قارچ بیمارگر با استفاده از روش دیسک کاغذی

در مورد عصاره‌های آبی از آب مقطر و در مورد عصاره‌های متانولی از متانول ۴۵درصد به‌عنوان حلال استفاده شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از هر نمونه (طی پنج مرحله، هربار ۱۰ میکرولیتر) با استفاده از سمپلر روی دیسک‌های کاغذ صافی به قطر شش میلی‌لیتر بارگذاری شد. در مرحلهٔ بعد قرص‌هایی به قطر شش میلی‌متر توسط چوب پنبه سوراخ‌کن از بیمارگر تهیه و در وسط پتری حاوی محیط PDA قرار داده شد. در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در انکوباتور، قطر کلنی قارچ بیمارگر بعد از ۲۴ ساعت به حدود ۱/۵ سانتی‌متر رسید. پس از این مرحله دیسک‌های حاوی عصاره‌ها در فاصلهٔ دو سانتی‌متری حاشیهٔ روییده قارچ قرار داده شد، سپس در فواصل زمانی مختلف،

شعاع هالهٔ بازدارندگی از روبرو پتری یادداشت برداری شد و میانگین آن در محاسبات لحاظ شد. در این آزمایش، از حلال مورد نظر به‌عنوان شاهد منفی استفاده شد. به‌منظور بررسی اثر ضد قارچی عصاره‌های موثر گیاهی قطعهٔ کوچکی از میسلیوم قارچ برداشته و روی محیط PDA واکشت شد تا رشد یا عدم رشد قارچ روی محیط کشت جدید بررسی شود (Hadian & Rahnama, 2011).

تأثیر عصاره‌های گیاهی بر رشد قارچ بیمارگر با استفاده از روش اختلاط با محیط کشت جامد

عصاره‌های گیاهی در غلظت‌های صفر (شاهد)، ۱۵۰، ۳۰۰، ۴۵۰ و ۶۰۰ پی پی‌ام به‌همراه ۰/۰۰۵ درصد توین ۸۰ به ارلن‌های حاوی محیط کشت PDA (پس ازاتوکلاو و در دمای۴۵ درجه سلسیوس) اضافه شد. در هر ظرف پتری ۲۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت PDA حاوی عصاره ریخته شد و فرصت داده شد که محیط سفت شود. پلاکی از حاشیهٔ کشت هفت روزهٔ قارچ بیمارگر *A. flavus* در مرکز ظروف پتری قرار داده شد و تا روز پنجم قطر مسلیومی آن اندازه‌گیری شد. تمامی مراحل در شرایط استریل و در سه تکرار صورت گرفت و همهٔ آزمایشات دو بار انجام شد (Nazerian & MirabolfathI, 2013). درصد بازدارندگی رشد میسلیومی هر تیمار از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد بازدارندگی رشد قارچ} = \frac{(A-B)}{A} \times 100$$

A: قطر کلنی در شاهد

B: قطر کلنی در تیمار

مقدار ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از هر عصاره در حلال مناسب حل شد و مورد استفاده قرار گرفت.

بررسی تأثیر عصاره در تجزیه آفلاتوکسین B1

یک میلی‌گرم در لیتر آفلاتوکسین B1 را به ویالهای ۲ میلی‌لیتری حاوی غلظت یک میلی‌گرم عصاره (اسطوخودوس و آویشن شیرازی) افزوده و روی شیکر انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سلسیوس و ۱۰۰ دور در دقیقه در شرایط تاریکی نگهداری شدند. پس از مدت ۲۴ ساعت مقادیر توکسین موجود، با استفاده از روش کروماتوگرافی لایهٔ نازک با کارایی بالا (HPTLC)، ارزیابی شد (Gorran *et al*., 2013).

بررسی تأثیر عصاره منتخب در مهار رشد قارچ و کاهش آفلاتوکسین B1 روی پسته

پسته‌های رسیده و سالم رقم اوحدی که پوسته سبز آنها به پوسته استخوانی نچسبیده بود، از باغ‌های منطقه رفسنجان جمع‌آوری شدند و پس از حذف پوسته سبز، پسته‌های خندان شده از پسته‌های خندان نشده تفکیک شده و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. جهت انجام آزمایش ابتدا با استفاده از اسکالپل سترون، روی مغز پسته‌ها در طول درز پوسته استخوانی با کمک سوزن سترون، زخمی به عمق دو و عرض یک میلی‌متر ایجاد شد (Farzaneh *et al*., 2012). سپس ۲۰ گرم پسته زخمی (۱۰ عدد) با غلظت ۲ و ۴ در هزار عصاره (۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ میلی‌گرم عصاره خشک در میلی‌لیتر آب مقطر استریل) به‌طور جداگانه به‌مدت ۱۵ دقیقه به‌روش غوطه‌ورسازی تیمار شدند و درون تشتک‌های پتری نه سانتی‌متری منتقل شدند. پس از خشک شدن سطحی، به‌میزان ۲۰ میکرولیتر از زادمایه 1×10^5 اسپور قارچ *A. flavus* IR6، به محل زخم هر پسته مایه‌زنی شد. پسته‌های مایه‌زنی شده به مدت هفت روز در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی نگهداری شد. جمعیت اسپور قارچ در گرم پسته محاسبه و میزان آفلاتوکسین نمونه‌ها، پس از استخراج، تعیین شد. به‌منظور اندازه‌گیری تعداد اسپورها بر روی مغز پسته، مغزهای کلونیزه شده به داخل ارلن های ۲۵۰ میلی لیتری حاوی آب مقطر استریل منتقل شد و ارلن‌ها به‌مدت ۱۲ ساعت روی شیکر قرار داده شدند. پس از آن، با استفاده از لام هماسیتومتر تعداد اسپورها شمارش شد.

استخراج و اندازه‌گیری آفلاتوکسین

استخراج آفلاتوکسین B1 موجود در محیط کشت مایع سه مرتبه طبق روش (Teniola *et al*., 2005) انجام شد به

این صورت که ۱۰ سی‌سی عصاره محیط کشت همراه با ۱۰ سی‌سی کلروفرم به درون قیف جداکننده (دکانتور) ریخته شد. سپس عصاره محیط کشت و کلروفرم با همزدن به خوبی مخلوط شدند و بعد از تبدیل به دو فاز، فاز بالایی (کلروفرم) که حاوی آفلاتوکسین بود در ظرفی شیشه‌ای ریخته شدند. سپس کلروفرم در دمای ۶۰ درجهٔ سلسیوس با استفاده از دستگاه روتاری تبخیر شد. در نهایت نمونه‌های حاصل در یک میلی‌لیتر متانول حل شده و حداکثر به مدت ۲۰ روز تا انجام آنالیزهای کروماتوگرافی در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس درون یخچال نگهداری شدند. جهت استخراج آفلاتوکسین از بستر پسته از ستون‌های ایمونوافینیتی (Puri-Fast AFLA BG IAC, LIBIOS Co., France) استفاده شد. به این صورت که ده گرم پسته خرد و آسیاب شده و میزان آفلاتوکسین آن به کمک ستون ایمنوافینیتی و طبق روش (Stroka *et al.*, 2000) استخراج شد. جهت انجام کروماتوگرافی و اندازه گیری آفلاتوکسین از دستگاه کروماتوگرافی لایهٔ نازک با کارایی بالا (HPTLC) استفاده شد. ابتدا هر نمونه در یک میلی‌لیتر کلروفرم به کمک دستگاه تولیدکننده امواج ماورای صوت، اولتراسونیک، کاملاً حل شد. سپس نمونه ها روی صفحه سلیکاژلی TLC Silica) gel 60 F254, (Merck, Darmstadt, به Germany به فاصله مناسب لکه‌گذاری شدند. سپس صفحات لکه‌گذاری شده در حلال کلروفورم-استون (به نسبت ۹ به ۱) قرار گرفته و عمل جداسازی آفلاتوکسین صورت گرفت. پس از جداسازی، صفحات مذکور درون دستگاه HPTLC قرار گرفته و با استفاده از نرم افزار (CAMAG VideoScan TLC/HPTLC Evalution Software V. 1.01) به‌صورت کیفی و کمی در طول موج برانگیختگی ۳۶۵ نانومتر و نشر ۴۲۰ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج

بررسی تأثیر عصاره در جلوگیری از رشد میسلیومی قارچ و تولید آفلاتوکسین

بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس، بین عصاره‌های گیاهان مختلف شامل اسطوخودوس، رازیانه، آویشن شیرازی و مرزه، بین غلظت‌های مختلف چهار نوع عصاره گیاه و بین دو نوع حلال آبی و متانولی و هم‌چنین اثرات متقابل گیاه، غلظت و نوع حلال از نظر توانایی در جلوگیری از رشد قارچ و هم‌چنین کاهش آفلاتوکسین B1 تفاوت معنی‌داری مشاهده شد. از نظر مهار رشد قارچ و کاهش آفلاتوکسین، غلظت ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره متانولی اسطوخودوس با میزان ۶۵/۶۳ درصد بیشترین تأثیر، و غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره آبی مرزه با میزان ۱۵/۴۶درصد کمترین تأثیر را نشان داد. به‌طور کلی با افزایش غلظت عصاره‌ها (به‌ترتیب ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) میزان رشد قارچ کاهش می یافت. برای مثال میزان رشد قارچ در عصارهٔ متانولی اسطوخودوس به‌ترتیب در غلظت‌های ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر به میزان ۳۵/۷۴، ۴۲/۳۲، ۵۸/۴۸ و ۶۵/۶۳ درصد نسبت به شاهد کاهش یافت، تأثیر عصاره‌ها در کاهش میزان آفلاتوکسین تولیدی مشهودتر بود، به‌طوری‌که به‌ترتیب ۷۳/۶۹، ۸۵/۷۰، ۹۸/۳۱ و ۱۰۰ درصد کاهش در میزان آفلاتوکسین تولیدی به‌ترتیب در غلظت‌های ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصارهٔ متانولی اسطوخودوس مورد مشاهده قرار گرفت. در مورد بقیهٔ عصاره‌های گیاهی روند دقیقاً مانند عصارهٔ اسطوخودوس بود. عصارهٔ آبی گیاه مرزه کمترین اثر را در مورد میزان آفلاتوکسین تولیدی از خود نشان داد به این صورت که به‌ترتیب غلظت‌های ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر این عصارهٔ آبی گیاه به میزان ۲۶/۱۱، ۳۱/۴۸، ۳۷/۳۸ و ۴۲/۲۱ از تولید افلاتوکسین B1 جلوگیری به عمل آورد (جدول ۱).

تأثیر عصاره‌های گیاهی بر رشد قارچ بیمارگر با استفاده از روش دیسک کاغذی

بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس، به احتمال ۹۹ درصد بین عصاره‌های گیاهان مختلف، در هر دو روش استفاده از عصاره‌های آبی و متانولی، و غلظت‌های مختلف آن‌ها و هم‌چنین بین اثرات متقابل این دو بر کاهش میزان

رشد هالهٔ قارچ، به روش آزمون دیسک اختلاف معنی‌دار وجود دارد. در این آزمون، عصارهٔ آبی اسطوخودوس با غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و ۳۹/۳۱ درصد ممانعت از قارچ و عصارهٔ آویشن شیرازی با غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر و ۲۹/۵۳ درصد ممانعت از قارچ بیمارگر، بهترین عصاره‌ها بودند. کمترین ممانعت کنندگی مربوط به تیمار مرزه آبی با غلظت ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود که میزان آن ۷/۰۳ درصد ممانعت از قارچ بود. در مورد عصاره‌های متانولی، عصاره‌های اسطوخودوس و عصارهٔ آویشن شیرازی با غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و به‌ترتیب۴۸/۳۳ و ۳۴/۱۶ درصد ممانعت از قارچ بیمارگر، به‌ترتیب بهترین عصاره‌ها بودند. کمترین ممانعت کنندگی مربوط به تیمار غلظت ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصارهٔ آبی و الکلی مرزه بود که میزان آن به‌ترتیب ۷/۰۳ و۱۰/۱۹درصد ممانعت از قارچ بود (نمودار ۱ الف و ب)

تأثیر عصاره‌های گیاهی بر رشد قارچ بیمارگر با استفاده از روش اختلاط با محیط کشت

بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس، به احتمال ۹۹ درصد بین عصاره‌های مورد بررسی، در هر دو روش استفاده از عصاره‌های آبی و متانولی، و غلظت‌های مختلف آن‌ها و هم‌چنین بین اثرات متقابل این دو بر کاهش میزان رشد هالهٔ قارچ، به روش آزمون اختلاط با محیط کشت اختلاف معنی‌دار وجود دارد. در این آزمون، عصارهٔ آبی اسطوخودوس و آویشن شیرازی با غلظت ۲۰۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و ۵۵/۹۶ و ۳۹/۵۴ درصد ممانعت از قارچ بیمارگر نسبت به شاهد به‌ترتیب بهترین عصاره‌ها بودند. کمترین درصد ممانعت از رشد قارچ بیمارگر نسبت به شاهد، مربوط به غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصارهٔ آبی رازیانه بود که میزان ۱۰/۶۵ درصد ممانعت از رشد نسبت به شاهد بود. در مورد عصاره‌های متانولی، روند دقیقاً مانند عصاره‌های آبی بود. عصاره‌های متانولی اسطوخودوس و آویشن شیرازی با غلظت‌های ۲۰۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و با ۴۷/۹۸ و ۳۶/۰۹ درصد ممانعت از قارچ بیمارگر نسبت به شاهد به‌ترتیب بهترین عصاره‌ها بودند. کمترین درصد ممانعت از رشد قارچ بیمارگر نسبت به شاهد، مربوط به غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصارهٔ متانولی مرزه بود که میزان آن ۱۴/۱۶ درصد ممانعت از رشد نسبت به شاهد بود (جدول ۲).

اثر عصاره‌های اسطوخودوس و آویشن شیرازی در تجزیه آفلاتوکسین

نتایج آزمون اندازه‌گیری آفلاتوکسین با دستگاه کروماتوگرافی لایه نازک با کارایی بالا (HPTLC) در نمونهٔ شاهد و نمونه هایی که از عصاره‌های آویشن شیرازی و اسطوخودوس در حلال متانولی استفاده شده بود در اشکال ۱ الی ۵ نشان داده شده است. بررسی نتایج آزمون اندازه‌گیری میزان آفلاتوکسین نشان داد که غلظت ۴۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسطوخودوس به‌میزان زیادی (۹۱/۱۸) از تولید افلاتوکسین کل در محیط کشت جلوگیری به‌عمل آورد (جدول ۳). بر اساس نتایج جدول ۳ و ۶ بین عصاره‌های مختلف (اسطوخودوس و آویشن شیرازی) و غلظت‌های مختلف آن دو (۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) تفاوت معنی‌داری در کاهش آفلاتوکسین *B1* در محیط‌کشت مشاهده شد. در غلظت ۴۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر عصارهٔ متانولی آویشن شیرازی مقدار تولید انواع افلاتوکسین به‌میزان زیادی نسبت به شاهد کاهش یافت (۴۸/۴۳)، این مقدار با میزان تولید آفلاتوکسین در غلظت ۴۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر عصارهٔ اسطوخودوس نیز دارای تفاوت معنی‌دار بود (جدول ۴). کاربرد غلظت ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصارهٔ اسطوخودوس و آویشن شیرازی باعث کاهش به‌ترتیب ۶۳/۲۶ و ۳۵/۱۷ درصدی عصاره نسبت به شاهد شد (جدول ۴).

در شکل ۱، یک پیک اصلی دیده می‌شود که مربوط به حلال متانول است اما در شکل ۲ یک پیک دیگر نیز دیده می‌شود که مربوط به آفلاتوکسین *B1* است با زمان بازداری (زمانی است که طول می‌کشد تا یک آنالیت خاص، تحت شرایط *set* از سیستم عبور (از ورودی ستون تا دتکتور) کند) ۵/۶۸ دقیقه این بدان معناست که در غلظت ۴۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصارهٔ اسطوخودوس مقداری آفلاتوکسین تولید

شده و غلظت‌های بالاتر از ۴۰۰۰ پی‌پی‌ام عصارهٔ اسطوخودوس، باعث جلوگیری از تولید آفلاتوکسین در روی محیط کشت شده است. همان‌طور که در کروتوگرام‌های مربوط به شاهد (غلظت صفر عصاره با وجود قارچ بیمارگر) و غلظت‌های ۵۰۰، ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر از عصارهٔ اسطوخودوس مشاهده می‌شود چهار پیک اصلی دیده می‌شود که در مورد غلظت ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصارهٔ اسطوخودوس بلندترین آن‌ها مربوط به آفلاتوکسین *B1* با زمان ماندگاری ۵/۷۵ دقیقه، آفلاتوکسین *G1* با زمان بارگذاری ۳/۵۸ دقیقه، آفلاتوکسین *B2* با زمان بارگذاری ۴/۴۲ دقیقه و آفلاتوکسین *G2* با زمان ماندگاری ۲/۸۲ دقیقه استخراج شده است. اما مقدار آفلاتوکسین در غلظت ۲۰۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اسطوخودوس کمتر از غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر است این در حالی است که در این غلظت (۵۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) نیز آفلاتوکسین‌های *B1* و *G1* بیشتر از بقیه آفلاتوکسین‌ها هستند. نتایج حاصل از کروماتوگرام ۱تا ۵ در جداول ۵ و ۶ نمایش داده شده است.

جدول۱- بررسی تأثیر عصاره‌های مختلف گیاهان در مهار رشد میسلیومی قارچ *Aspergillus flavus* و تولید آفلاتوکسین در محیط PDB پس از هفت روز نگهداری در دمای ۳۰ درجهٔ سلسیوس و شرایط تاریکی

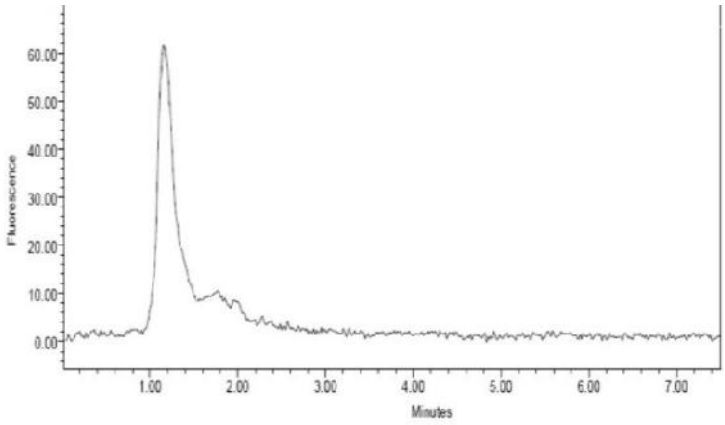
Table 1. Evaluation of the effect of different plant extracts on mycelial growth inhibition of *Aspergillus flavus* and aflatoxin production in PDB medium after seven days at 30 °C and darkness

Inhibition %		Concentration (µg/ml)	Extraction method	Plant species
Aflatoxin production	Mycelial growth			
68.33i	26.44mno	250	Aqueous extract	Lavender
79.39g	35.15hij	500		
91.15c	49.35ef	1000		
100.00a	58.28bc	2000		
73.69h	35.74ki	250	Methanolic extract	
85.70e	42.32hi	500		
98.31a	58.45bc	1000		
100.00a	65.63a	2000		
41.91o	19.72op	250	Aqueous extract	Fennel
51.25m	27.73lmn	500		
72.46h	31.86klmn	1000		
81.52f	46.65efg	2000		
56.73k	27.37lmn	250	Methanolic extract	
62.39j	33.92kjl	500		
78.27g	49.44def	1000		
85.39e	57.42bc	2000		
53.89l	25.27on	250	Aqueous extract	Thyme
62.40j	35.47ijk	500		
82.12f	41.67ghi	1000		
89.95cd	52.29cde	2000		
55.23kl	36.52ij	250	Methanolic extract	
72.11h	41.62ghi	500		
88.38d	55.96cd	1000		
95.21b	63.66a	2000		
26.11s	15.51p	250	Aqueous extract	Savory
31.48r	23.20on	500		
37.38p	27.76lmn	1000		
42.21o	32.75jklm	2000		
32.80r	36.16ij	250	Methanolic extract	
35.27q	28.64klmn	500		
44.29n	35.46ijk	1000		
52.14m	42.19ghi	2000		

جدول ۲- مقایسه میانگین مربوط به آزمون تأثیر عصاره‌های آبی و متانولی گیاهی بر میزان بازدارندگی از رشد قارچ بیمارگر *A. flavus* با استفاده از روش دیسک کاغذی

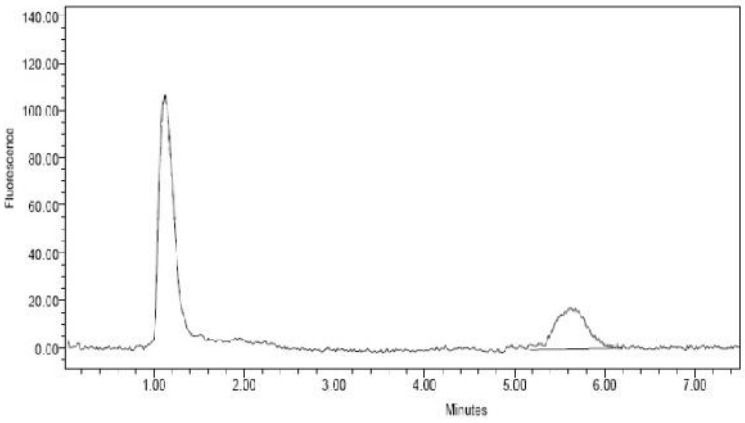
Table 2. Comparison of mean of test effect of aqueous and methanol extracts on inhibition of pathogenic fungus *Aspergillus flavus* using paper disk method

Inhibition percentage		Concentration(µg/ml)	Extraction method	Plant
Paper disk	Mixed withculturewith culture			
15.05k	12.29m	250	Aqueous extract	Lavender
22.65i	18.12kj	500		
35.84d	28.435fg	1000		
47.98b	39.315b	2000		
21.52i	18.26kj	250	Methanolic extract	
28.96f	24.27h	500		
39.41c	32.12e	1000		
55.96a	48.33a	2000		
10.65m	8.28o	250	Aqueous extract	Fennel
15.2k	11.69m	500		
24.01gh	17.58k	1000		
32.52e	25.28h	2000		
15.12k	12.21m	250	Methanolic extract	
21.03i	17.34k	500		
31.63e	24.54h	1000		
33.92e	28.33fg	2000		
16.85jk	14.2l	250	Aqueous extract	Thyme
20.36i	17.74k	500		
31.25e	24.08h	1000		
35.98d	29.53f	2000		
21.68i	36.095c	250	Methanolic extract	
27.56fg	24.40h	500		
35.41d	27.54g	1000		
39.54c	34.16d	2000		
12.58l	7.03o	250	Aqueous extract	Savory
14.52kl	10.24n	500		
24.02i	15.34l	1000		
26.54gh	19.45j	2000		
14.16kl	10.19n	250	Methanolic extract	
18.02j	14.35 L	500		
26.14g	18.72kj	1000		
29.45f	22.12i	2000		



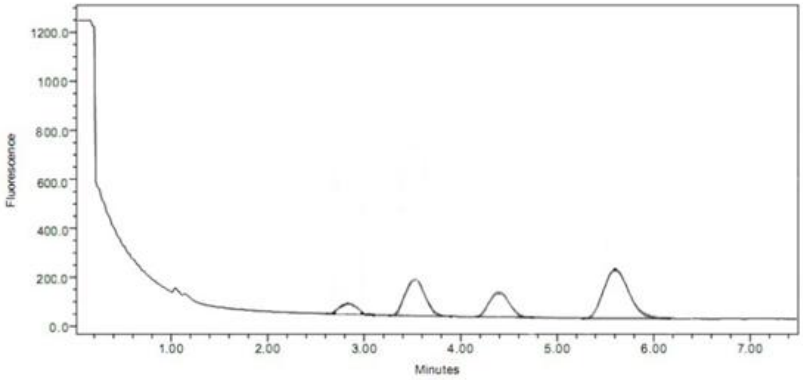
شکل ۱- کروماتوگرام مربوط به محیط کشت حاوی غلظت ۴۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره و بدون حضور قارچ

Figure 1. Chromatogram of medium containing 4000 mg/L extract without pathogen



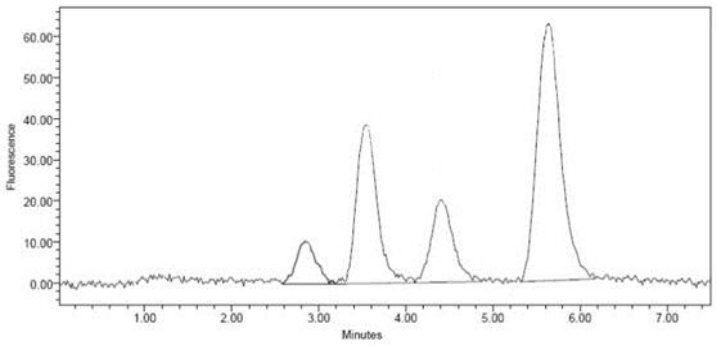
شکل ۲- کروماتوگرام مربوط به محیط کشت حاوی غلظت ۴۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصارهٔ اسطوخودوس به همراه قارچ بیمارگر

Figure 2. Chromatogram of the culture medium containing a concentration of 4000 mg/L of lavender extract with pathogen



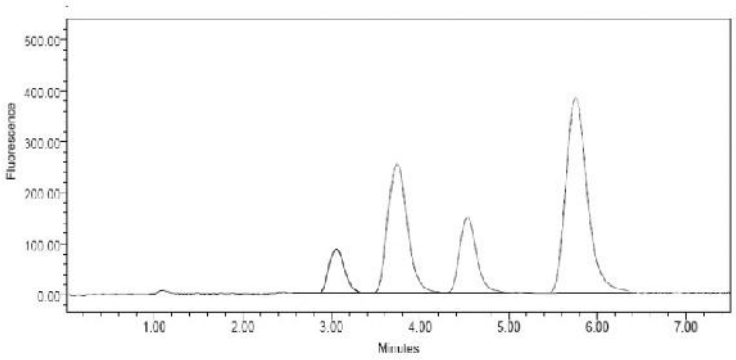
شکل ۳- کروماتوگرام مربوط به محیط کشت حاوی غلظت ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصارهٔ اسطوخودوس به همراه قارچ بیمارگر

Figure 3. Chromatogram of the culture medium containing a concentration of 2000 mg/L lavender extract with pathogen



شکل ۴- کروماتوگرام مربوط به محیط کشت حاوی غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصارهٔ اسطوخودوس به همراه قارچ بیمارگر

Figure 4. Chromatogram of the culture medium containing a concentration of 500 mg/L lavender extract with pathogen



شکل ۵- کروماتوگرام مربوط به محیط کشت حاوی قارچ بیمارگر و بدون عصارهٔ اسطوخودوس

Figure 5. Chromatogram of the culture medium containing the pathogen without lavender extract

جدول ۳- مقادیرآفلاتوکسین کل و B1 در محیط کشت همراه با غلظت‌های مختلف عصاره های اسطوخودوس و آویشن شیرازی

Table 3. The amounts of aflatoxin B1 and total in the culture medium with different concentrations of lavender and thyme extracts.

Aflatoxin B1 (ppb)	Total aflatoxin (ppb)	Concentration	Plant extract
7.99cd	25.48c	500	
4.57ef	14.42e	2000	Lavender
3.46f	3.46f	4000	
11.25b	32.17b	500	
8.56c	25.39c	2000	Thyme
4.52ef	20.24cd	4000	
0	0	4000	Control +Extract
14.85a	39.25a	0	Control

جدول ۴- بررسی تأثیر عصارهٔ گیاهان مختلف در بازدارندگی تولیدآفلاتوکسین کل و B1 قارچ *Aspergillus flavus* بر روی محیط کشت PDB (درصد کاهش افلاتوکسین نسبت به شاهد)

Table 4. The effect of different plant extracts on inhibition of *Aspergillus flavus* total aflatoxin and B1 production on culture medium (percentage reduction of aflatoxin compared to control aflatoxin

Aflatoxin B1 (ppb) production	Total aflatoxin (ppb) production	Concentration	Plant extract
46.19d	35e	500	Lavender
69.22c	63.26c	2000	
76.70b	91.18b	4000	
24.24f	18.03f	500	Thyme
42.36de	35.17e	2000	
69.56c	48.43d	4000	

جدول ۵- بررسی تأثیر عصارهٔ گیاهان مختلف در بازدارندگی از کلنیزاسیون (تشکیل اسپور) و تولیدآفلاتوکسین B1 قارچ *Aspergillus flavus* روی پسته پس از هفت روزنگهداری در دمای ۳۰ درجهٔ سلسیوس و شرایط تاریکی

Table 5. Study of the effect of different plant extracts on inhibition of colonization (spore formation) and aflatoxin B1 production of *Aspergillus flavus* on pistachio after seven days of storage at 30 C and dark conditions

Aflatoxin production %	Spore production %	Concentration	Solution	Plant extract
63.24b	59.84bc	2000	Aqueous extract	Lavender
72.25a	76.95a	4000		
59.98c	43.25f	2000	Methanolic extract	
61.69bc	56.42cd	4000		
51.75de	53.75de	2000	Aqueous extract	Thyme
58.42c	62.85b	4000		
42.45f	43.26f	2000	Methanolic extract	
49.25e	49.25e	4000		

بررسی اثر عصاره‌های اسطوخودوس و آویشن شیرازی در مهار رشد قارچ *A. flavus* و آفلاتوکسین روی پسته

بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس، به احتمال ۹۹ درصد بین عصارهٔ گیاهان مورد بررسی، در هر دو روش استفاده از عصاره‌های آبی و متانولی، و غلظت‌های مختلف آن‌ها و هم‌چنین بین اثرات متقابل این سه بر تولید اسپور در گرم مغز پسته، نسبت به تولید اسپور در تیمار شاهد ، ۸×۱۰^{۷}، اختلاف معنی‌دار وجود دارد. همان‌طور که جدول مقایسه میانگین ۸ نشان می‌دهد عصارهٔ آبی اسطوخودوس در غلظت ۴۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر بیشرین تأثیر را (۷۶/۹۵ درصد نسبت به شاهد) در کاهش میزان اسپور تولیدی به‌وسیلهٔ قارچ بیمارگر نشان داد، و این مقدار نسبت به سایر عصاره‌ها و غلظت‌های کاربری آن‌ها معنی‌دار بود و در بالاترین سطح از نظر آماری قرار داشت، بعد از عصارهٔ آبی اسطوخودوس (غلظت ۴۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) عصارهٔ آبی آویشن شیرازی با کنترل کنندگی به‌میزان ۶۲/۸۵ درصد نسبت به شاهد قرار داشت، که این میزان با غلظت ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصارهٔ آبی اسطوخودوس (با میزان ۵۹/۸۴درصد) اختلاف معنی‌دار نشان نداد. کمترین کنترل‌کنندگی میزان اسپور نسبت به شاهد مربوط به غلظت ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصارهٔ متانولی آویشن شیرازی با مقدار عددی ۴۳/۲۶درصد نسبت به شاهد بود، که این میزان نسبت به سایر تیمارها دارای اختلاف معنی‌دار بود.

نتایج میزان آفلاتوکسین موجود در پسته‌ها نشان داد که هر دو گیاه (اسطوخودوس و آویشن شیرازی) مورد مطالعه در غلظت‌های ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر باعث کاهش معنی‌دار میزان آفلاتوکسین تولیدی شدند. میزان

آفلاتوکسین B1 تولیدی در تیمار شاهد برابر با ۲۹۳۶۰ نانوگرم در گرم پسته بود. بیشترین قابلیت در مهار تولید آفلاتوکسین در در حضور غلظت ۴۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصارهٔ آبی اسطوخودوس مورد مشاهده قرار گرفت که میزان آفلاتوکسین B1 به ۸۱۴۸ نانوگرم در گرم تقلیل یافت. بعد از این تیمار غلظت ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصارهٔآبی اسطوخودوس با کاهش ۶۳/۲۴ درصد تولید آفلاتوکسین نسبت به شاهد قرار داشت، که این تیمار با تیمار غلظت ۴۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصارهٔ متانولی اسطوخودوس دارای اختلاف معنی‌دار نبود. کمترین میزان تولید آفلاتوکسین مربوط به غلظت ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصارهٔ آویشن شیرازی با میزان ۴۲/۴۵ درصد نسبت به شاهد بود (جدول ۵).

بحث

استفاده بی رویه از سموم شیمیایی توسط انسان لطمه‌های جبران ناپذیری را به محیط زیست وارد نموده، علاوه بر این به علت استفاده مداوم از این ترکیبات، آفات و بیماری‌های گیاهی به این سموم مقاوم شده و در دفعات بعدی استفاده از این ترکیبات شیمیایی، باید مقدار بیشتری از این مواد را استفاده نمود (Gholamnezhad *et al*., 2016).

نتایج حاصل از تأثیر عصاره‌های گیاهی بر وزن میسلیوم قارچ بیمارگر در محیط کشت نشان داد که عصاره‌های مورد استفاده در این تحقیق از رشد این قارچ بیمارگر در محیط کشت جلوگیری به عمل آوردند. نتایج حاصل از کاهش رشد قارچ به خصوص در مورد عصاره‌های اسطوخودوس و آویشن حاکی از کاهش چشمگیر رشد قارچ بیمارگر در محیط کشت بود (۶۵/۶۳ و ۶۳/۶۶ درصد در مورد عصاره متانولی). تفاوت در فعالیت ضد قارچی عصاره‌های گیاهی به اجزاء تشکیل دهنده آن‌ها بستگی دارد. یک ترکیب ممکن است به تنهایی یا به صورت تشدیدکنندگی با سایر ترکیب ها فعالیت ضد قارچی اسانس را باعث شود (Ghasemi *et al*., 2013). بنابراین به‌نظر می رسد اثرات ضد قارچی قابل توجه عصاره‌های مورد مطالعه در این تحقیق ضمن این‌که تحت تاثیر ترکیب غالب گیاه است، اما اثرات تشدیدکنندگی بین تمام ترکیب‌ها فاکتور عمده تعیین‌کننده فعالیت ضد قارچی بالای این عصاره‌ها به‌خصوص عصارهٔ گیاهان اسطوخودوس و آویشن شیرازی می‌باشد. کارواکرول یکی دیگر از ترکیباتی است که به وفور در عصاره گیاهان دارویی به‌خصوص گیاهان مطالعه شده در این تحقیق وجود دارد. به‌نظر می‌رسد کارواکرول از طریق افزایش pH واکوئل و خروج پروتون‌ها از لومن واکوئل منجر به اسیدی شدن سیتوزول شده و توازن Ca^{+2} و H^{+} را مختل می‌کند و نوسان سریع و شدید کلسیم سیتوزولی مکانیسمی است که توسط دو ایزومر فنولی کارواکرول و تیمول منجر به مرگ سلول‌های قارچی می‌گردد (Rao *et al*., 2010).

یحیی‌زاده و همکاران در سال ۲۰۰۸ اثر عصارهٔ رازیانه، میخک، آویشن و مریم‌گلی را روی رشد قارچ بیمارگر *A. flavus* بررسی کردند و نشان دادند آویشن و میخک در غلظت ۶۰۰ واحد در میلیون به‌طور کامل رشد قارچ را مهار می‌کنند (Yahyazadeh *et al*., 2008).

نتایج تحقیقات لطفی و همکاران (۲۰۱۰) نشان داد استفاده از عصارهٔ گیاهان آویشن، زنیان و پونه اثرات بازدارندگی بالایی بر رشد میسلیوم‌های قارچ *F. oxysporum* دارند به‌نحوی که در غلظت ۴۰۰ و ۳۰۰ پی‌پی‌ام از عصارهٔ گیاه آویشن رشد میسلیوم قارچ *F. oxysporum* به‌طور کامل مهار شد و در هر سه نمونه عصاره با افزایش غلظت اسانس رشد قارچ *F. oxysporum* کاهش یافت (Lotfi *et al*., 2010). نتایج تحقیقات افشاری و همکاران (۲۰۱۴) در راستای بررسی اثرات اسانس رازیانه بر رشد قارچ *Aspergillus flavus* نشان داد که این اسانس در غلظت۶۰۰ پی‌پی‌ام دارای بیشترین قدرت بازدارندگی رشد قارچ *A. flavus* بوده است.

گزارش‌های متعددی وجود دارد که نشان دهنده خواص ضدمیکروبی و ضدقارچی عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی است. ترکیباتی مانند بتا پینن، آلفا پینن، لینالول و کامفور از جمله آن‌هاست. از دیگر ترکیباتی که خاصیت ضدقارچی دارند می‌توان به سینئول،

سیمن، کامفن و آلفا ترپ ینئول، کارواکرول، لیمونن، کارون و برنئول اشاره نمود (Soltani *et al*., 2007). تیمول یکی از مهمترین ترکیبات عصاره و اسانس‌های گیاهانی مانند اسطوخودوس، رازیانه و آویشن دنایی می‌باشد (Stepanova *et al*., 2008).

علاوه بر این‌که رشد قارچ بیمارگر در محیط‌کشت مورد مطالعه کاهش یافت، در این مطالعه کاهش میزان آفلاتوکسین در محیط کشت مورد مشاهده قرار گرفت. البته کاهش این ترکیب می‌تواند در ارتباط مستقیم با کاهش میزان قارچ بیمارگر مورد بررسی باشد. زمانی که تولید بیومس قارچ بیمارگر کاهش می‌یابد و متعاقب آن میزان تولید آفلاتوکسین نیز کم می‌شود. از طرفی در ادامه این تحقیق مشاهده می‌شود که خودِ عصاره‌های گیاهی نیز باعث تجزیه مستقیم افلاتوکسین در محیط شده و از طریق دومکانیسم باعث کاهش این توکسین در محیط کشت می‌شوند. در پژوهشی نشان داده شد که درصد تجزیه آفلاتوکسین ناشی از بیمارگر *A. flavus* در عصاره‌های آبی بیشتر از عصاره اتانولی گیاه مرزهٔ ماکروسیفون می‌باشد. عصاره آبی گیاه مرزهٔ ماکروسیفون در مقایسه با اسانس و عصاره‌های اتانولی مرزه خوزستانی وخود مرزه ماکروسیفون دارای قدرت تجزیه کنندگی افلاتوکسین است. نتایج این تحقیق نشان داد که عصارهٔ آبی گیاه ماکروسیفون در غلظت ۴۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر سطح افلاتوکسین قابل ردیابی را ۳۲/۱۶ درصد کاهش داد و بر اساس روش HPTLC مساحت و شدت لکه فلورسنت آبی‌رنگ مربوط به آفلاتوکسین روی صفحه سیلیکاژل کاهش یافته و لکه فلورسنت در موقعیت دیگری روی صفحه مشاهده نشد. به‌عبارت دیگر محصول ناشی از آفلاتوکسین تجزیه شده توسط عصاره‌ها قابل ردیابی نبود که نشان می‌دهد ترکیب حاصله متفاوت از آفلاتوکسین می‌باشد (Gorran *et al*., 2015).

آن‌طورکه نتایج به دست آمده از آزمون استفاده از دیسک کاغذی نشان داد با افزایش غلظت عصاره‌های گیاهی، میزان فعالیت ضدقارچی افزایش پیدا می‌کند. بیشترین میزان فعالیت قارچ‌کشی مربوط به عصارهٔ گیاه اسطوخودوس بود. عصارهٔ این گیاه همراه با گیاه آویشن شیرازی تأثیر قارچ‌کشی قابل قبولی علیه قارچ بیمارگر *A. flavus* از خود نشان دادند، و هر چه بر میزان غلظت این ترکیب افزوده می‌شد، میزان فعالیت قارچکشی افزوده می‌شد. در مورد عصاره‌های متانولی نیز بیشترین میزان فعالیت ضد قارچی مربوط به غلظت ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصارهٔ اسطوخودوس و در رتبهٔ بعدی آویشن شیرازی بود. در مورد استفاده از عصاره‌های گیاهی به‌عنوان عامل کنترل‌کنندهٔ قارچ بیماری‌زا در آزمون دیسک کمترین میزان کنترل کنندگی هم مربوط به عصارهٔ گیاه مرزه با غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر بود.

نتایج استفاده از عصاره‌های گیاهی به روش اختلاط با محیط کشت علیه قارچ بیمارگر انطباق قابل توجهی با نتایج حاصل از آزمون دیسک داشت، و در این آزمون هم بهترین کنترل‌کنندگی مربوط به گیاه اسطوخودوس و در مرحلهٔ بعدی آویشن‌شیرازی در هر دو روش استفاده از حلال‌های آبی و متانولی بود.

در مورد مقایسهٔ استفاده از حلال آبی و متانولی، عصارهٔ متانولی در مورد هر دو روش دیسک کاغذی و اختلاط با محیط کشت اثر بازدارندگی بیشتری از خود نشان داد که این موضوع را می‌توان با تغییر در نوع حلال مرتبط دانست. زمانی که از عصارهٔ متانولی استفاده می‌شود احتمالاً مواد ضدقارچی بیشتری از هر دو گیاه قابل استحصال خواهد بود. کمترین میزان فعالیت ضد قارچی در مورد هر دو آزمون و روش‌های استحصال با حلال آبی و متانولی مربوط به مرزه و غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر بود. نتایج این مطالعه با نتایج مطالعهٔ دابابنه و امجد هم راستا بود (Dababneh & Khalil, 2007). در این مطالعه اثر هر چهار گونه گیاهی بر کاهش رشد قارچ بیمارگر مشهود بود. با توجه به هاله ممانعت از رشد قارچ، عصاره‌ها به خوبی توانسته‌اند رشد قارچ را کاهش دهند. بررسی‌ها نشان داده است که آویشن شیرازی یک منبع غنی از ترپنوئیدهای فنلی و کارواکرول می‌باشد.کارواکرول در گیاه آویشن باعث از بین رفتن غشا پلاسمایی، نشت دورن سلولی ATP و یون‌های پتاسیم و در نهایت از بین رفتن سلول بیمارگر می‌شود، بنابراین شاید

بتوان فعالیت های آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی عصارهٔ آویشن را به حضور این ترکیبات نسبت داد (Suareza *et al.*, 2015).

در این تحقیق عصاره‌های گیاهی اسطوخودوس و آویشن شیرازی در مواقعی حتی توانستند به طور مستقیم بر روی آفلاتوکسین تأثیر بگذارند و باعث تجزیه آن شود. در تحقیقات متعدد تأثیر مستقیم عصاره‌های گیاهی بر کاهش تولید افلاتوکسین‌ها به اثبات رسیده است (Krishnamurthy *et al.*, 2006; Thanaboripat *et al.*, 2004).

نتایج این تحقیق مشخص کرد علاوه بر گیاه، نوع حلال در استخراج مواد بازدارنده اهمیت بسیار زیاد دارد.جهت استخراج متابولیت های ضدقارچی از اندام هوایی، متانول در مقایسه با آب از کارایی بالاتری برخوردار بود و به عبارت دیگر در بین دو حلال استفاده شده در این تحقیق، متانول بیشتر به عنوان حلال کارساز بود. اثر بازدارندگی علاوه بر نوع حلال به غلظت مواد به کار رفته در تحقیق نیز بستگی دارد. در قسمت دیگری از این تحقیق نشان داده شد که جهت استخراج متابولیت ها از اندام‌های هوایی که توانایی تجزیه آفلاتوکسین B1 را دارند، متانول بهتر از آب عمل نمود و درصد کاهش تولید آفلاتوکسین بیشتر بود. این فرایند ممکن است به ترکیبات نامحلول در آب و محلول در الکل در ارتباط باشد، به صورتی که ترکیبات محلول در متانول توانایی بیشتر در تجزیه و کم نمودن آفلاتوکسین در محیط داشته باشند (Cowan, 1999).

در سال ۱۳۸۶ بررسی آزمایشگاهی اثرات ضد قارچی عصاره آبی آویشن شیرازی و ترکیب آن با فلوکونازول علیه گونه‌های *Candida* شایع جدا شده از ضایعات کاندیدیازیس انجام شد. نتایج نشان داد گونه‌های فوق خصوصا گونه‌های مقاوم مانند *Candida tropicalis* و *C. glabrata* به عصاره آبی سیر حساس می‌باشند و کاربرد این عصاره همراه با فلوکونازول به‌صورت موضعی می‌تواند باعث افزایش اثربخشی و کاهش میزان فلوکونازول مصرفی شود (Jafari Nodoushan et al., 2007).

در پژوهشی از عصاره‌های آبی و متانولی اسطوخودوس، رازیانه، پونهٔ آبی، آویشن شیرازی و اکالیپتوس جهت کنترل بیماری کپک خاکستری سیب با عامل *B. cinerea*، در آزمایشگاه و در انبار ۴ درجه سلسیوس استفاده شد. بر اساس نتایج، بعد از اسطوخودوس، عصارهٔ گیاه رازیانه در حلال‌های آبی، و عصارهٔ گیاه اکالیپتوس در حلال الکلی بهترین اثر کنترل کنندگی را در هر دو آزمون داشتند (Gholamnezhad, 2017).

در مورد آزمون استفاده از عصاره‌های گیاهی در کاهش میزان آفلاتوکسین روی مغز پسته هر دو عصارهٔ اسطوخودوس و آویشن‌شیرازی تأثیر معنی داری در کاهش این بیماری در مقایسه با شاهد داشتند و همان‌طور که انتظار می‌رفت عصارهٔ متانولی تأثیر بیشتری از عصارهٔ آبی در کنترل این بیماری داشت. که این موضوع را می‌توان با اثر قارچ‌کشی خود متانول که در اینجا به‌عنوان حلال به کار رفته مرتبط دانست. البته این کنترل بیشتر عصاره‌های الکلی علاوه بر اثر نوع حلال ممکن است به توانایی بیشتر الکل در استخراج ترکیبات ضدقارچی مرتبط دانست، که در قسمت قبلی در مورد این موضوع بحث شد. ترکیبات ضدقارچی که در محیط کشت به اشکال متفاوت قارچ را مورد کنترل قرار دادند بر روی پسته نیز قادر بودند که میزان رشد قارچ نیز کاهش دهند. در مطالعات مختلف اشکالی که به استفاده از عصاره‌های گیاهی برای کنترل بیماری‌های گیاهی وارد می شد، تجزیه شدن این ترکیبات در فضای بیرون و در انبار بود که نتایج این تحقیق نشان داد که نه تنها عصاره‌های گیاهی استفاده شده در این تحقیق به خوبی بیماری را در محیط کشت مورد کنترل قرار می‌دهند بلکه از پایداری خوبی در محیط انبار و محل نگهداری پسته‌ها برخوردار هستند و می‌توانند بیماری را در روی پسته نیز تحت کنترل خود درآورند. از طرف دیگر کاهش میزان آفلاتوکسین بر روی پسته‌های مورد مطالعه نشان داد که ترکیبات تجزیه کننده آفلاتوکسین بر روی پسته نیز قادر به کم کردن غلظت آفلاتوکسین هستند.

در تحقیق دیگری اثر ضد قارچی عصاره آویشن شیرازی و چویل بر قارچ عامل پژمردگی گوجه‌فرنگی، *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*، در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. نتایج

این تحقیق نشان داد که عصاره‌های به کار برده شده بر رشد این قارچ اثر بازدارندگی دارند که تأثیر عصارهٔ برگ آویشن شیرازی با غلظت ۱/۲ درصد بیشتر از برگ چویل ارزیابی گردید. در شرایط گلخانه‌ای نیز تاثیر گیاهان مذکور با سه غلظت فوق در یک طرح کامل تصادفی بر پایه فاکتوریل با ۱۲ تیمار انجام شد و شدت آلودگی با الگوی Ishikawa تعیین گردید. تیمارهای برگ آویشن شیرازی با غلظت ۰/۴، ۰/۸ و ۱/۲ درصد، برگ چویل با غلظت ۱/۲ و گل چویل با غلظت ۰/۸ و ۱/۲ درصد بهترین تیمارها در آزمایش گلخانه‌ای ارزیابی شدند (Ghazalbash *et al*., 2013).

در مطالعه‌ای اثر بازدارندگی آویشن شیرازی، نعنا فلفلی، رازیانه و اکالیپتوس علیه دو عامل اصلی پوسیدگی ریشه وطوقه لوبیا (*R. solani* و *F. solani*) بررسی شد. بر اساس نتایج این تحقیق ابتدا آویشن‌شیرازی و سپس نعنا فلفلی بیشترین اثر بازدارندگی (۱۰۰درصد) را در مورد هر دو بیمارگر در هر چهار غلظت به کار رفته در آزمون "ظرف پتری معکوس"، نشان دادند (Zandi et al., 2017).

آراس و وسایی اثر فعالیت سمی ۱۲ عصارهٔ گیاهی را در برابر قارچ‌های *P. digitatum*، *P. italicum* و *B. cinerea* بررسی کردند. میوه های پرتقال با اسپور *P. digitatum* مایه زنی و با محلول ۰، ۷۵، ۱۵۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر روغن آویشن اسپری شدند. نتایج نشان داد هیچ تفاوت معنی‌داری بین این تیمار و میوه‌ها با قارچ‌کش تیابندازول با غلظت ۲۰۰۰ mg/l نداشت (Arras & Vsai, 2000).

با توجه به مطالعاتی که صورت گرفته (Carson *et al*., 2006; Farzaneh *et al*., 2010) و بررسی اجزا و ترکیبات شرکت کنندهٔ در عصاره‌های گیاهی این مطلب استنباط می‌شود که فعالیت ضد قارچی عصاره‌های گیاهی به ترکیبات تشکیل دهندهٔ آن‌ها بستگی دارد، به طوری‌که یک ترکیب ممکن است به تنهایی یا به صورت هم‌افزایی با سایر ترکیبات فعالیت ضدقارچی عصاره را باعث شود تا در غلظت معینی تأثیر قابل قبولی داشته باشد و از طرفی دیگر نوع عصاره و غلظت‌های مختلف آن در میزان بازدارندگی از رشد میسلیومی قارچ و خاصیت قارچ‌کشی آن نقشی کلیدی دارد (Chaieb *et al*., 2017).

گندمی نصرآبادی و همکاران در سال ۲۰۰۸ به بررسی اثر آویشن شیرازی روی بیمارگر *Aspergillus flavus* پرداختند. نتایج حاصل از بررسی آن‌ها بیانگر اثرات بازدارندگی این اسانس (آویشن شیرازی) روی کپک‌ها بوده و این اسانس به‌عنوان جایگزینی برای مواد نگهدارنده‌های شیمیایی به صنعت غذایی معرفی کردند (Gandomi *et al*., 2008).

علاوه بر اثر مستقیمی که عصاره‌های گیاهی بر کاهش رشد قارچ بیمارگر و هم‌چنین تجزیهٔ آفلاتوکسین تولیدی از قارچ دارند، این عصاره‌ها می‌توانند مکانیسم‌های دفاعی را در گیاه و هم‌چنین میوهٔ تحت تیمار فعال نمایند و از این راه باعث افزایش مقاومت میوه در برابر قارچ بیمارگر شوند. نتایج مطالعات دیگر که در مورد بررسی بیان ژن‌های رمز کنندهٔ آنزیم‌ها و هم‌چنین بررسی فعالیت خود آنزیم‌ها بوده است نشان داده است که با بالا رفتن میزان بیان ژن‌های رمز کنندهٔ این آنزیم‌های دفاعی مانند پراکسیداز، کاتالاز و پلی‌فنل اکسیداز، میزان فعالیت این آنزیم‌ها نیز افزایش می‌یابد و عصاره‌های گیاهی می‌توانند به‌عنوان عامل محرک افزایش فعالیت‌های آنزیمی و در نتیجه افزایش مقاومت گیاهی عمل نمایند (Gholamnezhad *et al*., 2016 a,b,c).

نتیجه‌گیری کلی

تمامی عصاره‌های گیاهی استفاده شده در این تحقیق هر یک به میزانی قادر به کنترل قارچ مورد نظر در تست‌های آزمایشگاهی شدند و در نتیجه همه دارای مقادیری ترکیبات ضدقارچی بودند. زمانی که به روش‌های مختلف قارچ بیمارگر در آزمایش تحت تیمار عصاره های گیاهی مورد استفاده در این تحقیق قرار گرفت میزان رشد آن مخصوصاً در تیمار استفاده از اسطوخودوس و آویشن شیرازی کاهش پیدا کرد. از طرفی دیگر این دو عصاره بر روی خود آفلاتوکسین تأثیر گذاشتند و این ترکیب را کاهش دادند.

در آزمون استفاده از عصاره های گیاهی برای کاهش قارچ بیمارگر و هم‌چنین آفلاتوکسین‌های تولیدی از آن نیز

عصاره‌های گیاهی به خوبی عمل نموده و باعث کاهش رشد قارچ و متعاقب آن کاهش میزان آفلاتوکسین تولیدی شدند. موثر بودن عصاره‌های گیاهی در بر روی میوه‌های پستهٔ آلوده نشان می‌دهد که در شرایط انباری این عصاره‌ها سریع تجزیه نمی‌شوند و می‌توان با فرموله کردن این عصاره‌ها با ترکیبات مناسب در آینده آن‌ها در بازار عرضه نمود.

نظر به تأثیر بسیار خوب و قابل توجه عصاره‌های گیاهی هم در آزمایشگاه و هم در محیط انبار بر روی میوه‌های پسته عصاره‌های مورد مطالعه در این تحقیق به خصوص اسطوخودوس و آویشن شیرازی به‌عنوان ترکیبات با اثرات قارچ‌کشی بالا و دوستدار محیط زیست برای کم کردن میزان آفلاتوکسین، شناخته شدند.

References

Abdolmaleki, M., Bahraminejad, S., Abassi, S. & Mahmodi. S.B. 2010. Inhibitory effect of some plant extracts on mycelia growth of Rhizoctonia solani and *Phytophthora drechsleri*, sugar beet root rot agent. Journal of Sugar Beet, 5:193-205.

Abdul Aziz H, Omran A. & Zakaria, WR. 2010. H_2O_2 Oxidation of Pre-Coagulated Semi Aerobic Leachate. International Journal of Environmental Research, 4 (2): 209-216.

Achtman, M. & Wagner, M. 2008. Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. Nature Reviews Microbiology, 6: 431–440.

Adish, M., Fekri M. & H. Hokmabadi. 2010. Response of Badami- Zarand pistachio rootstock to salinity stress. International Journal of Nuts and Related Sciences, 1(1): 1-11.

Adish, M., Fekri, M. & Hokmabadi, H. 2010. Response of Badami-Zarand Pistachio Rootstock to Salinity Stress. International Journal of Nuts Related Science, 1(1): 1-11.

Adler H, Messerle M. & Koszinowski U.H. Cloning of herpesviral genomes as bacterial artificial chromosomes Rev. Med. Virol 2003; 13:111– 121.

Agrios, G.N., 2005. Plant Pathology. 5th ed. Academic Perss, San Diego, USA. 948pp.

Alam, P., Mohammad, A., Ahmad, M.M., Khan, M.A., Nadeem, M. 2014. Efficient method for *Agrobacterium* mediated transformation of *Artemisia annua* L. Recent Patents Biotechnology, 8: 102-107.

Anonymous, 2010. Annals of agricultural statistics. Department of Statistics and Information Department of Planning and Economic Affairs, Agriculture Organization of Khorasan Razavi.

Apel, K. & Hirt, H. 2004. Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. Annual Review of Plant Biology, 55: 373-379.

Ardakani, A. S., Gaur, H. S., Kamra A. & Mohan, S. 2009. Impact of *Azadirachta indica* (neem) seed and kernel extracts on *Meloidogyne incognita*, *Cephalobus persegnis* and *Heterorhabditis indica* in vitro. International Journal of Nematology, 19(1): 87-95.

Ark, P.A. & Gardner, M.W. 1956. Occurrence of angular leaf spot of cucumbers in California. Plant Disease Reporter, 40: 61-62.

Arras, G. & Vsai M. 2001. Fungitoxic activity of 12 essential oils against four postharvest citrus pathogens: chemical analysis of *thymus capitates* oil and its effectin subatomospheric pressure condition. Journal of Food Protection, 64:1025-1029.

Bagheri, V., Shamshiri, M.H., Shirani, H. & Roosta, H., 2012. Nutrient uptake and distribution in mycorrhizal pistachio seedlings under drought stress. Journal of Agricultural Science and Technology, 14 (Suppl.), 1591–1604.

Bahraminejad, S., Asenstorfer, R.E., Riley, I.T. & Schultz, C.J. 2008. Analysis of the antimicrobial activity of flavonoids and saponins isolated from the shoots oats (*Avena sativa* L.). Journal of Phytopathology, 156: 1 - 7.

Bakkali, F., Averbeck, S. & Averbeck, D. Idaomar M. Biological effects of essential oils. 2008. A review. Food Chemistry Toxicology, 46: 446–475.

Bayman, P., Baker, J. L., Doster, M. A., Michailides, T. J. & Mahoney, N. E. 2002. Ochratoxin production by the *Aspergillus ochraceus* group and *Aspergillus alliaceus*. Applied and Environmental Microbiology, 68: 2326-2329.

Beiko, R. G., Doolittle, W.F. & Charlebois, R.L. 2008. The impact of reticulate evolution on genome phylogeny. Systematic Biology, 57: 844–856.

Bidarigh, S., 1998. The Greenhouse Culture of Cucumber. Samar Publisher.

Bradbury, J. F. 1986. Guide to Plant Pathogenic Bacteria. CAB International Mycological Institute, p. 329.

Breitholtz-emanuelsson, A., Olsen, M., Oskarsson, A., Palminger, I. & Hult, K. 1992. Ochratoxin A in cow's milk and in human milk with corresponding human blood samples. Journal of AOAC International, 76, 842-

846.

Bui-Klimke, T.R., Wu, F. 2015. Ochratoxin A and human health risk: A review of the evidence. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 55(13): 14-51.

Burdman, S. & Walcott, R., 2012. Acidovorax citrulli: generating basic and applied knowledge to tackle a global threat to the cucurbit industry. Plant Pathology, 13 (8):805-815.

Burdman, S., Kots, N., Kritzman, G. and Kopelowitz, J. 2005. Molecular, physiological, and host-range characterization of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* isolates from watermelon and melon in Israel. Plant Disease, 89(12): 1339-1347.

Carson, C.F., Hammer, K.A., Riley, T.V. 2006. Melaleuca alternifolia (Tea Tree) Oil: A Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties, Clinical Microbiology Reviews, 19: 150-62.

Chaieb, K., Hajlaoui, H., Zmantar, T., Kahla-Nakbi, A.B., Rouabhia, M., Mahdouani, K., Bakhrouf, A. 2007. The chemical composition and biological activity of clove essential oil *Eugenia caryophyllata* (*Syzigium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. Phytotherapy Research, 21: 501-506.

Chitwood, D.J. 2002. Phytochemical based strategies for nematode control. Annual Review of Phytopathology, 40: 221–249.

Commission, C. A. 1998. Position paper on ochratoxin A. *CX/FAC*,14, 99. Cowan, M.M.1999. Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews, 12: 564-585.

Dababneh, B.F. & Khalil, A. 2007. The Inhibitory Effect of Extracts from Jordanian Medicinal Plants Against Phytopathogenic Fungi, Plant Pathology Journal, 6(2): 191-19.

Fani, S.R., Mirabolfathy, M. & H.R. Zamanizadeh. 2015. Identification of Pistachio Root and Crown Rot Casual Agents in Sistan Province, Journal of Pistachio Science and Technology, 1(2): 74-92.

Farzaneh, M., Ahmadzadeh, M., Hadian, J. & Tehrani, A.S. 2010. Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of three species of *Artemisia* on some soilborne phytopathogens. Communication of Agriculture Appllied Biology Science, 71: 1327-1333.

Farzaneh, M., Shi, Z.-Q., Ghassempour, A., Sedaghat, N., Ahmadzadeh, M., Mirabolfathy, M., & Javan-Nikkhah, M. 2012. Aflatoxin B1 degradation by *Bacillus subtilis* UTBSP1 isolated from pistachio nuts of Iran. Food Control, 23(1), 100-106.

Gandomi Nasrabady, H. et al. 2008. Effects of Zataria multiflora essence on Aspergillus flavus. Journal of Medicinal Plants, 27:45-51.

Gelderblom, W., Jaskiewicz, K., Marasas, W., Thiel, P., Horak, R., Vleggaar, R. & Kriek, N. 1988. Fumonisins--novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. Applied and Environmental Microbiology, 54: 1806-1811.

Ghasemi, S., Khoshgoftarmanesh, A.H. Afyuni, M. & Hadadzadeh, H. 2013. The effectiveness of foliar applications of synthesized zinc-amino acid chelates in comparison with zinc sulfate to increase yield and grain nutritional quality of wheat. European Journal of Agronomy, 45: 68-74.

Ghazalbash N., Abdollahi M. & Shahriari D. 2013. Antifungal effect of thyme extract of Shirazi and Choyil on tomato wilting fungus, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lyopersici*, in laboratory and greenhouse conditions. Plant Medicine (Scientific Journal of Agriculture). 36 (4): 53-65.

Gholamnejad, J., Etebarian, H.R. & Roustaee, A. Sahebani N. 2009. Biological control of apple blue mold by isolates of *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Plant Protection Research, 49: 270-275.

Gholamnezhad, J. 2017. Effect of plant extracts against apple gray mold caused by *Botrytis cinerea*. Applied Microbiology in Food Industries, 3(1): 53-66.

Gholamnezhad, J., 2019. Effect of plant extracts on activity of some defense enzymes of apple fruit in interaction with *Botrytis cinerea*. Journal of Integrative Agriculture, 17: 1-10.

Gholamnezhad, J., Sanjarian, F., Goltapeh, E.M., Safaei, N. & Razavi, K. 2016. Effect of salicylic acid on enzyme activity in wheat on immediate early time after infection with *Mycosphaerella graminicola.* Scientia Agriculturae Bohemica, 47 (1): 1–8.

Gholamnezhad, J., Sanjarian, F., Mohammadi Goltapeh, E., Safaei, N. & Razavi, Kh. 2012. The evaluation of salicylic acid effect on septorios disease by *Mycospharella graminicola*. Researches Plant Pathology 2 (2): 35-46.

Gorran, A., Farzaneh, M., Shivazad, M., Rezaeian, M. & Ghasempour, A. 2013. Aflatoxin B1-reduction of *Aspergillus flavus* by three medicinal plants (Lamiaceae). Food Control, 31: 218-223.

Gorran, A., Salehnia B., Farzaneh, H.R., Farzanehorcid, M. & Shivazad, M. 2015. Effect of essential oils and extracts of Satureja macrosiphon and Satureja khozistanica on mycelial growth and aflatoxin B1 production in *Aspergillus flavus*. Journal of Veterinary Research, 70(2): 139-145.

Hadian, S. & Rahnama, K. 2011. Comparing Neem extract with chemical control on *Fusarium oxysporum* and *Meloidogyne incognita* complex of tomato. Advances in Environmental Biology, 5(8): 2052-2057.

Han, Y.H. et al. 2008. Distribution of the tandem repeat sequences and karyotyping in cucumber (*Cucumis sativus* L.) by fluorescence in situ hybridization. Cytogenet. Genome Research, 122: 80–88.

Huang, S., Li, R., Zhang, Z., Li, L., Gu, X., Fan, W., Lucas, W. & Wang, X. 2009. The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L". Nature Genetics, 41 (12): 1275–1281.

Huyskens-Keil, S. & Schreiner, M. 2004. Quality dynamics and quality assurance of fresh fruits and vegetables in pre- and postharvest. PP. 401–449. In: Dris, R. and S. Jain (Eds.), Production.

Jafari Nodoushan AA, Dehghani M. & Mirbagheri S.M. 2007. In vitro antifungal effect of aqueous garlic Allium sativum extract and its combination with fluconazole against five common clinical *Candida* isolated from Candidiasis Lesions. J Kerman Uni Med Sci 14: 153-62. (in Persian with English abstract)

Javanmardi, J., Lesani, H. & Kashi, A. 2001. Effect of NaCl salinity on the uptake and transport of melons in five varieties of Iran native. Iranian Journal of Agricultural Sciences, 3 (1): 31-40.

Kim, S., Rayburn, A.L.,Voigt, T., Parrish, A. & Lee , D.K. 2012. Salinity Effects on Germination and Plant Growth of Prairie Cordgrass and Switchgrass, Journal of Bioenergy Research, (5): 225–235.

Krishnamurthy, Y.L. & Shashikala, J. Inhibition of aflatoxin B1 production of *Aspergillus flavus* isolated from soybean seeds by certain natural plants products. Letter Applied Microbiology, 2006; 43: 469- 74.

Lai, X., Liu, R, Ruan, C., Zhang, H. & Liu, C. 2000. Occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in rice samples from six provinces in china. Key Laboratory of Natural Pesticide and Chemical Biology. South China Agricultural University, Guangzhou, 510642, China, unpublished.

Liu, F., Andersen, M. N., Jacobsen, S. E., & Jensen, C. R. 2005. Stomatal control and water use efficiency of soybean *Glycine max* L. Merr.) during progressive soil drying. Environmental and Experimental Botany, 54(1): 33-40.

Lotfi, A., Jafarpour, M., Etemadi, N. 2010. Evolution effect of essential oil *Thyme ajowan* and Pennyroyal plant fungi *Fusarium oxysporum*. Fifth national conference new ideas in Agriculture University Azad Islamic Isfahan (Khorasgan), Faculty of Science Medicine, 16-17. (in Persian with English abstract)

Mahmoudi, R., Golchin, A., Hosseinzadeh, N. & Ghajarbeygi, P. 2014. Aflatoxin M1 and B1 contaminations in products of animal origin in Iran, The Journal of Qazvin University of Medical Sciences, 18 (4): 49-59.

Meeting, J. F. W. E. C. O. F. A. & Organization, W. H. 2007. Evaluation of certain food additives and contaminants*: sixty-eighth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*, World Health Organization.

Nazerian, E. & MirabolfathI, M. 2013. Characterization of *Phytophthora nicotianae* Pathogenic to *Chamaerops humilis* in Iran. International Journal of Agriculture and Forestry, 3(4): 159-161.

Pitt, J. 2000. Toxigenic fungi: which are important? Medical Mycology, 38: 17-22.

Rao, A., Zhang, Y., Muend, S. & Rao, R. 2010. Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 54: 5062-5069. 10.1128/AAC.01050-10.

Sheibani, A. 1994. Pistachio production in Iran. First International Symposium on Pistachio Nut, Adana, Turkey.

Skaug, M.A., Helland, I. & Solvoll, K. 2001. Saugstad OD. Presence of ochratoxin Ain human milk in relation to dietaryintake. Food Additives & Contaminants, 18(4): 321-327.

Soltani Tolarod, A.A., Saleh Rastin, N., Khavazi, K., & Asadi Rahmani, H. 2007. Isolation and evaluation of PGP characteristics of some fluorescent Pseudomonads of Iranian soils. Iranian Journal of Soil and Water Research, 21(2): 277-289.

Sorrenti, V., DI Giacomo, C ,.Acquaviva, R., Barbagallo, I., Bognanno, M. & Galvano, F. 2013. Toxicity of ochratoxin a and its modulation by antioxidants: A review. Toxins, 5: 1742-1766.

Stepanova, A.N., J. Robertson-Hoyt, J., Yun, L. M. Benavente, D. Y. Xie, K. Dolezal, S. G. Jurgens, & J. M. Alonso. 2008. TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. Cell, 133:177-191.

Stroka, J., Anklam, E., Jörissen, U. & Gilbert, J. 2000. Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography using post-column bromination for determination of aflatoxins in peanut butter, pistachio paste, fig paste, and paprika powder: collaborative study. Journal of AOAC International 83: 320–340.

Suareza, C., Cardinalea, M., Rateringa, S., Steffensb, D., Jungb, S., Zapata, A M., Rita, M., Plauma, G & Schnella, S. 2015. Plant growth-promoting effects of *Hartmannibacter diazotrophicus* on summer barley (*Hordeum vulgare* L.) under salt stress. Applied Soil Ecology, 95: 23–30.

Tavallali, V., Rahemi, M. & Panahi. B. 2008. Calcium induces salinity tolerance in pistachio rootstocks. Fruits, 63: 201-208.

Teniola, O. D., Addo, P. A., Brost, I. M., Farber, P., Jany, K. D., Alberts, J. F., Van Zyl, W. H., Steyn, P. S. & Holzapfel, W.H. 2005. Degradation of aflatoxin B (1) by cell-free extracts of *Rhodococcus erythropolis* and *Mycobacterium fluoranthenivorans* sp. nov. DSM 44556(T). International Journal of Food Microbiology, 105: 111-117.

Tester, M. & Davenport, R.J. 2003. Na+ transport and Na+ tolerance in higher plants. Annual of Botany, 91: 503–527.

Thanaboripat, D., Mongkontanawut, N., Suvathi, Y. & Ruangrattametee, V. 2004. Inhibition of aflatoxin production and growth of *Aspergillus flavus* by citronella oil. KMITL Science and Technology Journal, 4(1): 1-8.

Wu, Q.S. & Y.N. Zou. 2009. Arbuscular mycorrhizal symbiosis improves growth and root nutrient status of citrus subjected to salt stress. Science Asia, 35: 388–391.

Yahyazadeh, M., Omidbaigi, R., Zare, R. & Taheri, H., 2008. Effect of some essential oils on mycelial growth of *Penicillium digitatum* Sacc. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 24: 1445-1450.

Yonemura, I., Nakada, K. & Sato, A. 2007. Direct cloning of full length mouse mitochondrial DNA using a Bacillus subtilis genome vector. Gene 391:171– 177.

Zandi, Sh., And Hemmati, R., Rezaei, S. & Movahedi Fazel, M. 2017. Study of the effect of some plant essential oils on two fungal agents of bean root rot *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani* in Zanjan province. Iranian Medicinal and Aromatic Plants Research, 33 (3): 411-422.

Control of *Aspergillus* and related aflatoxin production by using different plant extracts

Soodeh Karimi[1], Jalal Gholamnezhad[2], Mojdeh Maleki[1]

1. Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Tehran, Iran
2. Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Ardakan University, Ardakan, Iran

Corresponding author: Jalal Gholamnezhad; Email: jgholamnezhad@ardakan.ac.ir

Received: Nov., 24, 2020 8(1) 117-136 Accepted: Feb., 15, 2021

Abstract

Pistachio is an important export product in Iran. This product is constantly threatened by *Aspergillus flavus* and its aflatoxin. Researchers are now looking to use alternative non-hazardous methods instead of other methods of management of plant diseases, such as the use of chemical pesticides. Plant extracts as an environmentally friendly method can be a good alternative to chemicals. In this study, the effect of plant extracts including lavender (*Lavandula stoechas*), thyme (*Thymus vulgaris*), fennel (*Foeniculum vulgare*) and savory (*Satureja hortensis*) on the amount of degradation and aflatoxin production *in vitro*, by paper disk methods and mixing the extract with the culture medium, as well as in the storage conditions and on pistachio were investigated. The results showed that using of 2000 mg/L methanol extract reduced the growth of pathogenic fungus by 65.63%. In the tests of using the extracts on the paper disc as well as mixing the extracts with the culture medium, aqueous extract of lavender with a concentration of 2000 µg/ml prevented the growth of pathogen by 39.31 and 55.96%, respectively, and thyme extract with a concentration of 2000 µg/ml inhibited the fungal growth by 29.33% and 39.54%, respectively. These extracts had the highest effect on the pathogen growth. When the extracts were applied directly to aflatoxin, the results showed that the concentration of 4000 mg/L lavender prevented the aflatoxin production in the culture medium by 91.18%. Finally, aqueous extract of lavender at 4000 mg/L showed the highest effect (76.95% compared to control) in reducing the amount of spores produced by pathogenic fungi on pistachio fruit. The results of aflatoxin content in pistachio showed that both studied plants (lavender and thyme) at concentrations of 2000 and 4000 mg/L significantly reduced the amount of aflatoxin produced. Due to the remarkable and good effect of plant extracts on pistachio fruit under both *in vitro* and in the storage, the studied extracts, especially lavender and thyme, are natural compounds with high fungicidal effect and environmentally friendly effects.

Keywords: pistachio, *Aspergillus flavus*, aflatoxin, plant extracts