



اثرات اسانس های هل، سقز و میخک بر کنترل و بیان برخی از ژنهای مایکوتوکسین داکسی نیوالنول فوزاریوم گرامینه آروم

احمد مهربان^۱، جواد آبخو^{۲*}

^۱استادیار، گروه زراعت دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زاهدان، زاهدان، ایران. ^۲آمری، پژوهشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: قارچ فوزاریوم گرامینه آروم عامل بیماری اسکب در گندم و سایر غلات دانه ریز است. زیرالنون (Zearalenone) و داکسی نیوالنول (Deoxynivalenol) مهمترین مایکوتوکسین های این قارچ هستند. این پژوهش با هدف ارزیابی تاثیر اسانس های هل، سقز و میخک بر مهار رشد فوزاریوم گرامینه آروم و بیان برخی از ژنهای موثر در زیست ساخت داکسی نیوالنول انجام شد. **مواد و روش ها:** پس از کشت فوزاریوم گرامینه آروم در محیط Potato Dextrose Broth. حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) رشد قارچ تحت اثر اسانس ها با استفاده از روش میکروتیتر پلیت اندازه گیری شد. همچنین بیان ژنهای *TRI5*، *TRI6* و *TRI14* با تکنیک Real-time PCR ارزیابی شد.

یافته ها: اسانس هل کمترین مقدار MIC (۱۰۰ میکرولیتر بر میلی لیتر) و اسانس های سقز و میخک بیشترین مقدار MIC ۲۰۰ میکرولیتر بر میلی لیتر) را داشتند. اسانس هل با کمترین مقدار غلظت قارچ کشی (MFC) (۲۰۰ میکرولیتر بر میلی لیتر) بالاترین خاصیت قارچ کشی روی فوزاریوم گرامینه آروم را داشت و اسانس های سقز و میخک بیشترین مقدار MFC (۴۰۰ میکرولیتر بر میلی لیتر) را داشتند. میزان بیان ژنهای *TRI5*، *TRI6* و *TRI14* به طور معنی داری توسط اسانس هل کاهش یافت. **نتیجه گیری:** نتایج این تحقیق نشان داد که اسانس هل دارای خاصیت قارچ کشی و مهارکنندگی بر رشد قارچ فوزاریوم گرامینه آروم است و موجب کاهش میزان بیان ژنهای *TRI5*، *TRI6* و *TRI14* موثر در تولید داکسی نیوالنول می گردند. **واژگان کلیدی:** گیاهان دارویی، فعالیت ضدقارچی، داکسی نیوالنول، فوزاریوم گرامینه آروم.

پذیرش برای چاپ: شهریور ماه ۹۷

دریافت مقاله: مرداد ماه ۹۷

مقدمه

۱۶ ژن در تولید سم داکسی نیوالنول نقش دارند که ژنهای *TRI1* و *TRI2* روی کروموزم شماره ۱، ژنهای *TRI3*، *TRI4*، *TRI5*، *TRI6*، *TRI7*، *TRI8*، *TRI9*، *TRI10*، *TRI11*، *TRI12*، *TRI13* و *TRI14* روی کروموزم شماره ۲، ژن *TRI15* روی کروموزم ۳ و ژن *TRI101* روی کروموزم شماره ۴ قرار دارند (۴ و ۵). قارچ کش های شیمیایی که برای کنترل بیمارگرهای گیاهی استفاده می شوند اثرات خطرناک بر روی سلامت مصرف کنندگان دارند (۶). بنابراین مطالعات روی استفاده از

قارچ فوزاریوم گرامینه آروم (*Fusarium graminearum*) باعث بیماری اسکب در گندم و سایر غلات دانه ریز می شود (۱) و زیرالنون (Zearalenone) و داکسی نیوالنول (Deoxynivalenol) سموم مهم این قارچ هستند (۲). داکسی نیوالنول باعث سرطان مری در انسان می شود (۳). تعداد

* آدرس برای مکاتبه: زابل، دانشگاه زابل، پژوهشکده کشاورزی

پست الکترونیک: javad.abkhoo@yahoo.com

تلفن: ۰۹۱۵۱۹۷۰۷۲۵



مواد و روش‌ها

(الف) تهیه اسانس‌های گیاهی: اسانس‌های هل، سقز و میخک از شرکت نگین (تولید شده در مقیاس صنعتی) به دست تهیه گردید.

(ب) تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت قارچ‌کشی (MFC): برای تعیین MIC اسانس‌های گیاهی از روش میکروتیتر پلیت استفاده شد (۱۸). اسانس‌های گیاهی به صورت سریال از ۴۰۰ تا ۳.۱۲۵ میکرولیتر بر میلی‌لیتر رقیق شدند. در هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت اسانس با ۱۰۰ میکرولیتر محیط Potato Dextrose Broth (PDB; Scharlau Chemie, S.A., Spain) مخلوط شد. قارچ فوزاریوم گرامینه‌آروم از موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور تهیه گردید. سوسپانسیون اسپور قارچ با استفاده از روش آبریل (Abril) و همکاران تهیه شد و تعداد کنیدیوم‌ها در میلی‌لیتر با استفاده از لام هموسایتومتر شمارش و غلظت نهایی اسپور روی 2×10^6 کنیدیوم در میلی‌لیتر تنظیم شد (۱۹). در شرایط استریل به هر چاهک حاوی رقت‌های مختلف اسانس ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون قارچی افزوده شد. همچنین ۲ چاهک نیز با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت PDB که یکی حاوی ۱۰ میکرولیتر اسپور قارچی و دیگری فاقد اسپور قارچی بود به عنوان کنترل‌های مثبت و منفی در نظر گرفته شد. پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۲۵ درجه سلیسیوس، چاهک‌ها از نظر رشد پرگنه‌های قارچی بررسی شد. بدین ترتیب که عدم رشد پرگنه‌های قارچی در چاهک نشان دهنده عدم رشد قارچ و تأثیر مثبت مهارکنندگی اسانس در رقت مورد نظر بود.

برای تعیین MFC اسانس‌های گیاهی از روش اسپینل-اینگراف (Espinel-Ingroff) و همکاران استفاده شد (۲۰). پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون در دمای ۲۵ درجه سلیسیوس ۲۰ میکرولیتر از چاهک‌های فاقد رشد قارچ و کنترل مثبت روی محیط Potato Dextrose agar (PDA; Liofilchem, Italy) کشت داده شد. کم‌ترین رقت موجود از اسانس که رشد قارچ مشاهده نگردید به عنوان MFC هر اسانس در نظر گرفته شد.

(ج) بررسی اثر اسانس هل بر بیان ژن‌های موثر در زیست‌ساخت

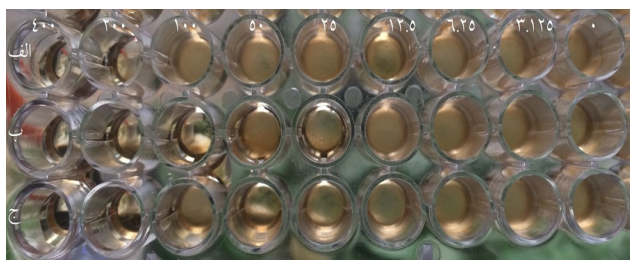
ترکیبات طبیعی به ویژه اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی در جلوگیری از رشد این قارچ و تولید زهرابه داکسی‌نیوالنول متمرکز شده است (۷-۱۰).

گیاهان دارویی هل سبز (*Elettaria cardamomum*)، سقز (*Pistacia atlantica*) و میخک (*Eugenia caryophyllata*) آثار ضدقارچی آن‌ها به اثبات رسیده است. اسانس هل دارای خاصیت بازدارندگی علیه سراتوسیستیس پارادوکسا (*Ceratocystis paradoxa*) است (۱۱) و عصاره‌های اتانولی و استونی هل رشد گونه‌های بیماری‌زای کاندیدا آلبیکنس (*Candida albicans*) را مهار کردند (۱۲).

بررسی‌ها نشان داده که عصاره سقز دارای خواص بازدارندگی علیه قارچ‌های کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا گالبراتا (*C. glabrata*)، کاندیدا تروپیکالیس (*C. tropicalis*)، کاندیدا کروزوئی (*C. krusei*)، آسپرژیلوس نایجر (*Aspergillus niger*)، آسپرژیلوس فلاووس (*A. flavus*) و آسپرژیلوس فومیگاتوس (*A. fumigates*) است (۱۳). اسانس میخک در روش غذای مسموم در غلظت ۳۰۰ ppm و در روش تدخینی در غلظت ۴۵۰ و ۶۰۰ ppm خاصیت قارچ‌کشی علیه بوتریتیس سینرئا (*Botrytis cinerea*) دارد (۱۴). همچنین در غلظت ۲۵۰ میکرولیتر در لیتر قادر به مهار کامل رشد قارچ آسپرژیلوس پارازیتیکوس (*A. parasiticus*) می‌باشد (۱۵).

از طرفی در غلظت ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم اسانس در هر کیلوگرم دانه ذرت اثر بازدارندگی بر روی رشد قارچ فوزاریوم گرامینه‌آروم (۹) و بر روی رشد قارچ فوزاریوم گرامینه‌آروم در روش دیسک آغشته به ۵ میکرولیتر اسانس فاقد اثر بازدارندگی است (۱۶).

همچنین حداقل غلظت بازدارندگی آن بر روی قارچ بوتریتیس سینرئا در غلظت ۵۰۰ میکرولیتر در لیتر و بر روی قارچ آلترناریا سولانی (*Alternaria solani*) و فوزاریوم سولانی (*F. solani*) در غلظت ۲۰۰ میکرولیتر در لیتر گزارش شد (۱۷). هدف از این مطالعه بررسی تأثیر اسانس‌های هل، سقز و میخک بر رشد فوزاریوم گرامینه‌آروم و بیان برخی از ژن‌های موثر در زیست‌ساخت داکسی‌نیوالنول بود.



شکل ۱: سطح کلنی قارچ فوزاریوم گرامینه‌آروم در غلظت‌های مختلف اسانس‌های میخک (الف)، هل (ب)، سقز (ج) و کنترل مثبت (غلظت صفر).

با تکثیر ژن‌های *TRI5*، *TRI6*، *TRI14* و همچنین ژن *EF1a* کارایی PCR برای تمامی این ژن‌ها بر اساس فرمول $Efficiency = [10^{-(1/slope)}] - 1$ ارزیابی کمی میزان بیان ژن با استفاده از روش مقایسه چرخه آستانه ($C_T = Cycle$ threshold) انجام شد. تغییرات نسبی بیان ژن‌های هدف نسبت به ژن خانه‌دار *EF1a* نرمال سازی شد (۲۲). محاسبه و تغییرات بیان ژن به وسیله نرم افزار REST اندازه‌گیری شد (۲۳).

(د) تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه واریانس با استفاده از نسخه بیستم نرم‌افزار SPSS و مقایسه میانگین با استفاده از آزمون *t* در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

یافته‌ها

(الف) بررسی اثر اسانس‌ها در جلوگیری از رشد قارچ فوزاریوم گرامینه‌آروم: حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت قارچ‌کشی (MFC) سه اسانس گیاهی در پلیت تعیین شد. نتیجه اثردهی غلظت‌های مختلف اسانس‌های هل، سقز و میخک در جلوگیری از رشد قارچ فوزاریوم گرامینه‌آروم دو روز پس از انکوباسیون در دمای ۲۵ درجه سلیسیوس در شکل

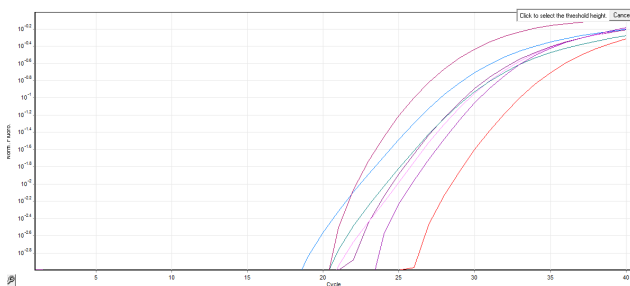
جدول ۲: حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت قارچ‌کشی (MFC) اسانس‌های گیاهی در کنترل فوزاریوم گرامینه‌آروم.

گونه گیاهی	حداقل غلظت قارچ‌کشی (میکرولیتر بر میلی‌لیتر)	حداقل غلظت بازدارندگی (میکرولیتر بر میلی‌لیتر)
میخک	۴۰۰	۲۰۰
هل	۲۰۰	۱۰۰
سقز	۴۰۰	۲۰۰

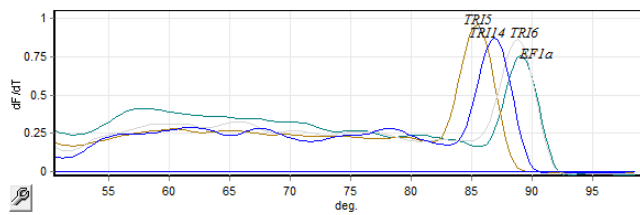
داکسی‌نیوالنول: قارچ فوزاریوم گرامینه‌آروم در محیط PDB در حضور اسانس هل با غلظت $100 \mu l mL^{-1}$ کشت داده شده و به مدت ۳ روز در گرمخانه ۲۵ درجه سلیسیوس نگهداری شد (۲۱). استخراج RNA از قارچ توسط کیت شرکت TOPAZ GENE RESEARCH انجام شد و برای بررسی کمیت و کیفیت مولکول‌های mRNA از روش طیف‌سنجی با دستگاه بیوفتومتر و ژل آگاروز استفاده شد. جهت سنتز رشته اول cDNA از کیت RevertAid First Strand cDNA synthesis kit (ترموفیشر، والتام، MA، آمریکا با شماره K1621) استفاده شد. به منظور بررسی میزان بیان ژن‌های مورد نظر (جدول ۱) از تکنیک Real-Time PCR استفاده شد. واکنش‌ها در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۴ میکرولیتر EvaGreen® qPCR Mix Plus (BioDyne, Riia, Estonia)، یک میکرولیتر آغازگر رفت (۱۰ میکرومولار)، یک میکرولیتر آغازگر برگشت (۱۰ میکرومولار) ۱۳ میکرولیتر آب و یک میکرولیتر از نمونه cDNA بود. واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز شامل مرحله واسرشت سازی اولیه پانزده دقیقه در ۹۵ درجه سلیسیوس سپس ۴۰ سیکل شامل ۲۰ ثانیه در ۹۵ درجه سلیسیوس، ۲۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سلیسیوس و ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سلیسیوس بود. هر آزمون در سه تکرار زیستی و دو تکرار فنی انجام شد. پس از اتمام چرخه‌های PCR منحنی ذوب به منظور بررسی اختصاصیت واکنش PCR رسم گردید. برای تعیین بازدهی ژن‌های هدف (*TRI5*، *TRI6*، *TRI14*) و ژن خانه‌دار (*EF1a*) رقت‌های متوالی از cDNA تهیه و واکنش Real-time PCR انجام گرفت. با توجه به شیب منحنی استاندارد (Slope) مرتبط

جدول ۱: مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش.

منبع	ژن	توالی آغازگر
۲۴	<i>TRI5</i>	F:5'-TCTATGGCCCAAGGACCTGTTGA-3'
		R:5'-TGACCAAACCATCCAGTTCTCCA-3'
۲۴	<i>TRI6</i>	F:5'-TGTCGCTACTCAGAATGCC-3'
		R:5'-CCCTGCTAAAGACCCTCA-3'
۲۴	<i>TRI14</i>	F:5'-CTGATAAGCTTGAACCACCTCG-3'
		R:5'-TTGATCACAACGGGAGTTC-3'
۲۲	<i>EF1a</i>	F:5'-TCACCGACTACCCTCCTCT-3'
		R:5'-TCGACGGCCTTGATGACAC-3'



شکل ۳: منحنی تکثیر برای ژن‌های هدف



شکل ۲: آنالیز منحنی ذوب برای ژن‌های *TR15*، *EF1a*، *TRI14* و *TRI16*. هر یک از قله‌ها نمایان گر دمای ذوب یک محصول PCR است.

و در غلظت MFC قارچ را می‌کشد. (ب) ارزیابی بیان ژن‌های *TR15*، *TRI16* و *TRI14* با تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس هل با تکنیک *Real-Time PCR* با توجه به داده‌های به دست آمده از رسم نمودار منحنی استاندارد مشخص شد که بازده واکنش برای ژن‌های *TR15*، *TRI16* و *TRI14* به ترتیب ۰/۹۵، ۰/۹۵ و ۱/۰۵ بود. شرایط بهینه طوری فراهم شد که بازدهی واکنش با تکنیک *Real-Time PCR* در بهترین حالت ممکن و هیچ محصول غیراختصاصی در طول واکنش تولید نشود که این امر با استفاده از منحنی ذوب (مشاهده یک پیک ذوب منفرد) تأیید شد (شکل ۲). شکل ۳ منحنی پیشرفت واکنش تکثیر ژن را در زمان واقعی یعنی در طول هر سیکل برای ژن‌های هدف نشان می‌دهد. نتایج C_T مربوط به هر یک از ژن‌ها در جدول ۳ مشاهده می‌شود. در جدول ۴ نتایج بررسی میزان بیان ژن *TR15* در نمونه‌های تیمار شده با اسانس هل (با غلظت ۱۰۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر) و غیرتیمار شده (شاهد) قارچ فوزاریوم گرامینه‌آروم مشاهده می‌شود. پس از تیمار با اسانس هل کاهش ۴۱/۸۰٪ در سطح نسخه‌ی ژن *TR15* مشاهده شد. نتایج اختلافات معنی‌داری را

جدول ۴: میزان بیان ژن‌های *TR15*، *TRI16* و *TRI14* در نمونه‌های تیمار

شده با اسانس هل (با غلظت ۱۰۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر) و غیرتیمار شده (۰) قارچ فوزاریوم گرامینه‌آروم.

ژن	اسانس هل (میکرولیتر بر میلی‌لیتر)	
	۰	۱۰۰
<i>TR15</i>	۰/۹۷۶	۰/۵۶۸
<i>TRI16</i>	۱/۰۰۳	۰/۷۲۱
<i>TRI14</i>	۰/۹۹۷	۰/۰۸۳

سطوح mRNA ژن‌ها در نمونه‌های تیمار شده و شاهد تفاوت‌های معنی‌داری داشتند ($p < 0.05$).

۱ نشان داده شد. بررسی‌های نشان داد که در چاهک کنترل مثبت قارچ فوزاریوم گرامینه‌آروم تمامی سطح چاهک را پوشاند و در سایر چاهک‌ها با افزایش غلظت اسانس‌ها میزان رشد قارچ کاهش یافته است و مقایسه چاهک‌ها با کنترل مثبت توانایی مهار رشد قارچ توسط اسانس‌ها را اثبات کرد. MIC اسانس‌های هل، سقز و میخک به ترتیب ۱۰۰، ۲۰۰ و ۲۰۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر تعیین شدند (جدول ۲). مقادیر MIC در محدوده ۱۰۰ تا ۲۰۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر بودند و اسانس هل کم‌ترین غلظت MIC (۱۰۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر) و اسانس‌های سقز و میخک بیشترین غلظت MIC (۲۰۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر) را داشتند.

اثر قارچ‌کشی غلظت‌های اسانس‌های هل، سقز و میخک روی فوزاریوم گرامینه‌آروم در جدول ۲ نشان داده شد. MFC اسانس‌های هل، سقز و میخک به ترتیب ۲۰۰، ۴۰۰ و ۴۰۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر تعیین شدند (جدول ۲). اسانس هل کم‌ترین غلظت MFC (۲۰۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر) و بالاترین خاصیت قارچ‌کشی روی قارچ فوزاریوم گرامینه‌آروم را داشت. در غلظت MIC برای ۴۸ ساعت از رشد قارچ جلوگیری می‌کند

جدول ۳: میزان C_T ژن‌های *TR15*، *TRI16* و *TRI14* در نمونه‌های تیمار

شده با اسانس هل (با غلظت ۱۰۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر) و غیرتیمار شده (شاهد) قارچ فوزاریوم گرامینه‌آروم.

ژن	اسانس هل (میکرولیتر بر میلی‌لیتر)	
	۰	۱۰۰
<i>TR15</i>	۲۰/۳۶	۲۲/۴۳
<i>TRI16</i>	۱۸/۹۳	۲۰/۶۸
<i>TRI14</i>	۱۸/۰۵	۲۲/۸۵

خود نشان داد که با نتایج این تحقیق مشابهت دارد (۱۱). همچنین مطالعات ویجایالاکشمی (Vijayalakshmi) و همکاران نشان داد که عصاره‌های اتانولی و استونی هل دارای اثر مهارى بر گونه‌های بیماریزای *کاندیدا آلبیکنس* هستند (۱۲). در مطالعات آنیجا (Aneja) و شارما (Sharma) عصاره‌های آلی میوه هل فعالیت ضد میکروبی علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*)، پروتئوس میرابیلیس (*Proteus mirabilis*)، اشریشیا کلی (*Escherichia coli*)، *اسیتوباکتر* (*Acinetobacter sp.*) و *کاندیدا آلبیکنس* نشان دادند (۲۵).

در این تحقیق اسانس هل میزان بیان ژن‌های *TRI5*، *TRI6* و *TRI14* را کاهش داد. ژن *TRI5* اولین ژن در مسیر زیست‌ساخت داکسی نیوالنول است که آنزیم تریکوداین سنتاز (*trichodiene synthase*) را کد می‌کند و این آنزیم فارنزیل پیرو فسفات (*farnesyl pyrophosphate*) را به تریکوداین تبدیل می‌کند (۲۶ و ۲۷). ژن *TRI6* فاکتور نسخه‌برداری مرتبط با بیان سایر ژن‌های موثر در مسیر زیست‌ساخت داکسی نیوالنول را کد می‌کند (۲۶). در سال‌های گذشته مطالعاتی در مورد بیان ژن‌های *TRI5*، *TRI6* و *TRI14* انجام شده است. از جمله بررسی‌های دایر (Dyer) و همکاران نشان داده است که حذف ژن *TRI14* از قارچ فوزاریوم گرامینه‌آروم توانایی تولید داکسی نیوالنول در گیاه را کاهش می‌دهد و این ژن برای تولید داکسی نیوالنول در گیاه مورد نیاز است اما در شرایط آزمایشگاهی (*in vitro*) مورد نیاز نیست (۲۸).

پینسون‌گادایز (Pinson-Gadais) و همکاران اثر غلظت‌های مختلف یون منیزیم (Mg^{2+}) را بر رشد و تولید تریکوتسین‌های تایپ بی (*type-B trichothecenes*) قارچ فوزاریوم گرامینه‌آروم بررسی کردند. یون منیزیم منجر به کاهش شدید توکسین شد. افزودن یون منیزیم به محیط کشت به طور معنی‌داری بیان ژن‌های *TRI5*، *TRI6* و *TRI12* را کاهش داد. مهار تولید توکسین توسط یون منیزیم با مهار رونویسی ژن *TRI5* همبستگی زیادی داشت و به میزان کمتری با مهار رونویسی ژن‌های *TRI6* و *TRI12* همبستگی داشت (۲۹).

بین میزان بیان ژن *TRI5* در نمونه‌های تیمار شده و غیر تیمار شده در سطح ۵ درصد نشان داد. نتایج بررسی میزان بیان ژن *TRI6* در نمونه‌های تیمار شده با اسانس هل (با غلظت ۱۰۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر) و غیر تیمار شده (شاهد) قارچ فوزاریوم گرامینه‌آروم در جدول ۴ مشاهده می‌شود. پس از تیمار با اسانس هل کاهش ۲۸/۱۱٪ در سطح نسخه‌ای ژن *TRI6* مشاهده شد. نتایج اختلافات معنی‌داری را بین میزان بیان ژن *TRI6* در نمونه‌های تیمار شده و غیر تیمار شده در سطح ۵ درصد نشان داد. نتایج بررسی میزان بیان ژن *TRI14* در نمونه‌های تیمار شده با اسانس هل (با غلظت ۱۰۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر) و غیر تیمار شده (شاهد) قارچ فوزاریوم گرامینه‌آروم در جدول ۴ مشاهده می‌شود. پس از تیمار با اسانس هل کاهش ۹۱/۶۷٪ در سطح نسخه‌ای ژن *TRI14* مشاهده شد. نتایج اختلافات معنی‌داری را بین میزان بیان ژن *TRI14* در نمونه‌های تیمار شده و غیر تیمار شده در سطح ۵ درصد نشان داد.

بحث

در این تحقیق، خواص ضدقارچی اسانس هل علیه یک جدایه توکسین‌زای قارچ فوزاریوم گرامینه‌آروم و تاثیر آن در ارتباط با کاهش بیان ژن‌های مسیر زیست‌ساخت داکسی نیوالنول، یعنی ژن‌های *TRI5*، *TRI6* و *TRI14* بررسی شد. پژوهش‌های مختلف فعالیت ضد میکروبی هل در غلظت‌های خاص را نشان داده است. خطیب (Khatib) و همکاران فعالیت ضد قارچی اسانس سه گونه گیاهی شامل گیاه آلوئه ورا (*Aloe vera*)، هل سبز و رزماری (*Rosmarinus officinalis*) را روی رشد قارچ *سراتوسیستیس پارادوکسا* با استفاده از روش دیسک کاغذی در غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۵ و ۵۰ میکرولیتر بر دیسک بررسی کردند. نتایج نشان داد که در بین اسانس‌های مورد استفاده، اسانس هل با غلظت ۲۵ و ۵۰ میکرولیتر بر دیسک بهترین تاثیر را علیه *سراتوسیستیس پارادوکسا* دارد و نسبت به اسانس رزماری و آلوئه ورا از مهارکنندگی بیشتری برخوردار بود به طوری که از غلظت ۲۵ میکرولیتر بر دیسک به بالا توانست رشد بیمارگر را به طور کامل متوقف نماید و آثار ضدقارچی از

نتیجه گیری

ساخت داکسی نیوالنول مورد بررسی قرار گیرد. همچنین ارزیابی تکمیلی در شرایط درون سلولی (*in vivo*) می تواند به فهم بهتر مکانیسم تاثیر عصاره های گیاهی کمک نماید.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از آقای مهندس هاشم خندان بارانی به دلیل همکاری در اجرای این پژوهش کمال سپاس را دارند.

به طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که اسانس هل در شرایط آزمایشگاهی دارای خاصیت قارچ کشی و مهارکنندگی بر رشد قارچ فوزاریوم گرامینه آروم است و در کاهش میزان بیان ژن‌های *TRI5*، *TRI6* و *TRI14* که برای تولید داکسی نیوالنول نقش‌هایی مهمی بازی می‌کنند موثر است. پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی، اثر اسانس هل بر روی سایر ژن‌های موثر در زیست

References

1. McMullen M, Jones R, Gallenberg D. Scab of wheat and barley: a reemerging disease of devastating impact. *Plant Dis.* 1997; 81(12): 1340e1348.
2. Bottalico A, Perrone G. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in smallcereals in Europe. *Eur J Plant Pathol.* 2002; 108(7): 611-624.
3. Luo Y, Yoshizawa T, Katayama T. Comparative study on the natural occurrence of *Fusarium mycotoxins* (trichothecenes and zearalenone) in corn and wheat from high- and low-risk areas for human esophageal cancer in China. *Appl Environ Microbiol.* 1990; 56(12):3723-3726.
4. Alexander NJ, Proctor RH, McCormick SP. Genes, gene clusters, and biosynthesis of trichothecenes and fumonisins in *Fusarium*. *Toxin Rev.* 2009; 28(2-3): 198-215.
5. Lee J, Jurgenson JE, Leslie JF, Bowden RL. Alignment of genetic and physical maps of *Gibberella zeae*. *Appl Environ Microbiol.* 2008; 74(8): 2349-2359.
6. Harris CA, Renfrew MJ, Woolridge MW. Assessing the risk of pesticide residues to consumers: recent and future developments. *Food Addit Contam.* 2001; 18(12): 1124-1129.
7. Pagnussatt FA, Del Ponte EM, Garda-Bufferon J, Badiale-Furlong E. Inhibition of *Fusarium graminearum* growth and mycotoxin production by phenolic extract from *Spirulina* sp. *Pestic Biochem Physiol.* 2014; 108: 21-26.
8. Marín S, Velluti A, Ramos AJ, Sanchis V. Effect of essential oils on zearalenone and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* in non-sterilized maize grain. *Food Microbiol.* 2004; 21(3): 313-318.
9. Velluti A, Sanchis V, Ramos AJ, Turon C, Marín S. Impact of essential oils on growth rate, zearalenone and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* under different temperature and water activity conditions in maize grain. *J Appl Microbiol.* 2004; 96(4): 716-724.

10. Lahooji A, Mirabolfathy M, Karami-Osboo R. Effect of *Zataria multiflora* and *Satureja hortensis* essential oils, thymol and carvacrol on growth of *Fusarium gramineum* isolates and deoxynivalenol production. Iran J Plant Pathol. 2010; 46(1): 37-50.
11. Khatib A, Mahmoudi H, Derakhshan A. 2016. Assessment of antifungal activity potential several plant essential oils against *Ceratocystis paradoxa*. Proceedings of 22nd Iranian plant protection congress. 27–30 Aug, Karaj, Iran. 319.
12. Vijayalakshmi P, Thenmozhi S, Rajeswari P. The Evaluation of the virulence factors of clinical *Candida* isolates and the anti-biofilm activity of *Elettaria cardamomum* against multi-drug resistant *Candida albicans*. Curr Med Mycol. 2016; 2(2): 8-15.
13. Shialy Z, Zarrin M, Sadeghi Nejad B, Yusef Naanaie S. *In vitro* antifungal properties of *Pistacia atlantica* and olive extracts on different fungal species. Curr Med Mycol. 2015; 1(4): 40-45.
14. Vesaltalab Z, Gholami M. The effect of clove buds and rosemary extracts and essences on control of *Botrytis cinerea* growth. Plant Prod Technol. 2010; 11(2): 1-11.
15. Sanchulli N, Ghaffari M, Qaraee A. Comparison of antifungal effects of essential oils of *Zataria multiflora* boiss, *Cuminum cyminum* and *Eugenia caryophyllata* with formalin on aflatoxin-producing fungus *Aspergillus parasiticus*. J Comp Pathol. 2015; 12(3): 1691-1698.
16. Ćosić J, Vrandečić K, Postić J, Jurković D, Ravlić M. *In vitro* antifungal activity of essential oils on growth of phytopathogenic fungi. Agriculture. 2010; 16(2): 25-28.
17. Moosavian SM, Darvishnia M, Derikvand N. 2016. Effect of clove (*Eugenia caryophyllata*) essential oil in inhibiting growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani* and *Aspergillus niger*. Proceedings of 22nd Iranian plant protection congress. 27–30 Aug, Karaj, Iran. 310.
18. Eloff JN. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. Planta Medica. 1998; 64(8): 711-713.
19. Abril M, Curry KJ, Smith BJ, Wedge DE. Improved microassays used to test natural product based and conventional fungicides on plant pathogenic fungi. Plant Dis. 2008; 92: 106-112.
20. Espinel-Ingroff A, Fothergill A, Peter J, Rinaldi MG, Walsh TJ. Testing conditions for determination of minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for *Aspergillus* spp.: NCCLS Collaborative Study. J Clin Microbiol. 2002; 40(2): 3204-3208.
21. Jahanshiri Z, Shams-Ghahfarokhi M, Allameh A, Razzaghi-Abyaneh M. Inhibitory effect of eugenol on aflatoxin B1 production in *Aspergillus parasiticus* by down-regulating the

- expression of major genes in the toxin biosynthetic pathway. *World J Microbiol Biotechnol.* 2015; 31(7): 1071-1078.
22. Kim HK, Yun SH. Evaluation of potential reference genes for quantitative RT-PCR analysis in *Fusarium graminearum* under different culture conditions. *Plant Pathol J.* 2011; 27(4): 301-309.
23. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST[®]) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30(9): 1-10.
24. AlTaweel Kh, Amarasinghe ChC, Brûlé-Babel AL, Dilantha Fernando WG. Gene expression analysis of host-pathogen interaction between wheat and *Fusarium graminearum*. *Eur J Plant Pathol.* 2017; 148(3): 617-629.
25. Aneja KR, Sharma C. Antimicrobial potential of fruit extracts of *Elettaria cardamomum* maton (chhoti elaichi) against the pathogens Causing ear infection. *Pharmacol Online.* 2010; 3: 750-756.
26. Trapp SC, Hohn TM, McCormick S, Jarvis BB. Characterization of the gene cluster for biosynthesis of macrocyclic trichothecenes in *Myrothecium roridum*. *Mol Gen Genet.* 1998; 257 (4): 421-432.
27. Rynkiewicz MJ, Cane DE, Christianson DW. Structure of trichodiene synthase from *Fusarium sporotrichioides* provides mechanistic inferences on the terpene cyclization cascade. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98(24): 13543-13548.
28. Dyer RB, Plattner RD, Kendra DF, Brown DW. *Fusarium graminearum TRI14* is required for high virulence and DON production on wheat but not for DON synthesis *in vitro*. *J Agric Food Chem.* 2005; 53(23): 9281-9287.
29. Pinson-Gadais L, Richard-Forget F, Frasse P, Barreau C, Cahagnier B, Richard-Molard D, Bakan B. Magnesium represses trichothecene biosynthesis and modulates *Tri5*, *Tri6*, and *Tri12* genes expression in *Fusarium graminearum*. *Mycopathologia.* 2008; 165(1): 51-59.



The effects of essential oils of *Elettaria cardamomum*, *Pistacia atlantica* and *Eugenia caryophyllata* on control and expression of some genes of mycotoxin deoxynivalenol in *Fusarium graminearum*

Ahmad Mehraban¹, Javad Abkhoo²

¹Assistant Professor, Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Zahedan Branch, Islamic Azad University, Zahedan, Iran.

²Instructor, Agricultural Research Institute, University of Zabol, Zabol, Iran.

Abstract

Background & Objectives: *Fusarium graminearum* is the causal agent of scab disease in wheat and other small grains. Zearalenone and deoxynivalenol are the main toxins produced by *F. graminearum*. In this study, the effects of essential oils of *Elettaria cardamomum*, *Pistacia atlantica*, and *Eugenia caryophyllata* on *F. graminearum* growth inhibition and the expression of some genes in deoxynivalenol biosynthetic pathway were investigated.

Materials & Methods: Minimal inhibitory concentration (MIC) of the fungal growth was measured through the microtiter plate method after growing *F. graminearum* on Potato Dextrose Broth. In addition, the expression of *TRI5*, *TRI6*, and *TRI14* genes were evaluated using real-time PCR (qRT-PCR) technique.

Results: *Elettaria cardamomum* essential oil had the lowest MIC (100 µl/ml) and the essential oils of *P. atlantica* and *E. caryophyllata* had the highest MIC (200 µl/ml). *Elettaria cardamomum* essential oil had the lowest MFC (200 µl/ml) and the highest fungicidal property against *F. graminearum*, and the essential oils of *P. atlantica* and *E. caryophyllata* had the highest MFC value (400 µl/ml). The expression of *TRI5*, *TRI6*, and *TRI14* genes was significantly decreased by *E. cardamomum* essential oil.

Conclusion: The results of the study showed that the *E. cardamomum* essential oil has fungicidal and inhibitory effects against *F. graminearum* and leads to reduce the expression of *TRI5*, *TRI6*, and *TRI14* genes relating to deoxynivalenol production.

Keywords: Medical plants, Antifungal activity, Deoxynivalenol, *Fusarium graminearum*.

Correspondence to: Javad Abkhoo

Tel: +98 9151970725

E-mail: javad.abkhoo@yahoo.com

Journal of Microbial World 2019, 12(1): 53-61.



Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.