مجله دنیای میکروب‌ها
سال یازدهم شماره اول (پیاپی ۳۴) بهار ۱۳۹۷
صفحات ۱۰۰-۸۸

Original Article

ارزیابی خاصیت ضد قارچی عصاره گیاه رزماری و تاثیر آن در بیان ژن *AFL1* قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* با استفاده از روش Real-Time PCR

مجتبی محمدی[۱]، سید جمال هاشمی*[۲]، ساسان رضایی[۳]، منصور بیات[۴]

[۱] دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، [۲] استاد، گروه قارچ شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، [۳] استاد، گروه قارچ شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، [۴] استاد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران.

چکیده

سابقه و هدف: رزماری گیاه دارویی مهمی است که تاکنون خاصیت ضد میکروبی آن بر روی قارچ های بیماری زا و توکسین زا کمتر مورد توجه قرار گرفته است. دست یابی به گیاهان دارویی، با توجه به محدود بودن داروهای ضد قارچی و مقاومت حاصل از آنها می تواند حائز اهمیت باشد. این مطالعه با هدف ارزیابی خاصیت ضد قارچی عصاره گیاه رزماری بر روی قارچ های *آسپرژیلوس فلاووس*، *کاندیدا آلبیکنس*، *اپیدرموفایتون فلوکوزوم*، *ترایکوفایتون وروکوزوم* و تاثیر این عصاره در بیان ژن *AFL 1* قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* با استفاده از روش Real -Time PCR انجام شد.

مواد و روش ها: در ابتدا قارچ های *آسپرژیلوس فلاووس* و *کاندیدا آلبیکنس* بر روی محیط سابرودکستروز آگار و درماتوفیت های *ترایکوفایتون وروکوزوم* و *اپیدرموفایتون فلوکوزوم* بر روی محیط مایکوسل آگار با تراکم نیم مک فارلند کشت داده شدند. خاصیت ضد قارچی گیاه رزماری با روش انتشار در دیسک ارزیابی گردید. سپس غلظت موثر عصاره رزماری به کمک ده لوله استاندارد و محیط مایع سابرودکستروز براث محاسبه شد. در نهایت تاثیر عصاره بر بیان ژن *AFL 1* با روش RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: عصاره رزماری بر روی انواع گروه های قارچی اثر بازدارندگی داشت. به طوری که متوسط قطر هاله عدم رشد حدود ۱۶ تا ۱۸ میلی متر تعیین گردید. MIC موثر برای قارچ *کاندیدا آلبیکنس* ٤ تا ٦ میلی گرم بر میلی لیتر، برای قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* ۳ تا ۵ میلی گرم بر میلی لیتر و برای درماتوفیت های *ترایکوفایتون وروکوزوم* و *اپیدرموفایتون فلوکوزوم* نیز ٤ تا ٦ میلی گرم بر میلی لیتر تعیین شد. همچنین نتایج Real -Time PCR نیز مهار ژن تولید کننده آفلاتوکسین را در سطح مولکولی به خوبی به اثبات رسانید.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که عصاره رزماری می تواند رشد قارچ ها را مختل نماید و به طور قابل توجهی تاثیر مهارکنندگی بر بیان ژن *AFL 1* و تولید آفلاتوکسین در قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* دارد.

واژگان کلیدی: گیاهان دارویی، *آسپرژیلوس فلاووس*، *اپیدرموفایتون فلوکوزم*، *ترایکوفایتون وروکوزوم*، *کاندیدا آلبیکنس*.

دریافت مقاله: تیر ماه ۹۶ پذیرش برای چاپ: مرداد ماه ۹۶

مقدمه

بیماری های قارچی انسانی به عنوان پدیده بزرگ قرن بیستم و بیست و یکم شناخته شده اند. استفاده از کورتیکواستروییدها و داروهای ضد میکروبی در طب بالینی، باعث افزایش فراوانی بیماری های قارچی شده است. تجویز عوامل ضد میکروبی و استفاده از وسایل پزشکی در بیمارانی که وضعیت وخیمی از نظر سیستم ایمنی دارند موجب شده که این بیماران نسبت به بیماری های قارچی حساسیت ویژه ای پیدا کنند (۱ و ۲).

امروزه تعداد زیادی از داروهای ضد قارچی در دنیا تولید

*) آدرس برای مکاتبه: تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، گروه قارچ شناسی پزشکی.
تلفن: ۰۹۱۲۱۰۰۹۱٤۱ پست الکترونیک: sjhashemi@tums.ac.ir

می شود. اما مساله اصلی مقاومت دارویی به این درمان ها می باشد. همچنین در مبارزه با سم آفلا توکسین متاسفانه هنوز راه زیادی در پیش می باشد. به همین دلیل یافتن درمان های جدید و یا موادی که اثر ضد قارچی داشته باشند همواره مورد توجه پژوهشگران حوزه های مختلف می باشد (۳ و ٤).

قارچ های جنس *آسپرژیلوس* (*Aspergillus*) به صورت کونیدیا (conidia) و به طور گسترده ای در محیط پخش شده اند. این قارچ ها جزو فلور طبیعی آب و خاک هستند و موجب آلودگی وسیع می گردند. *آسپرژیلوس* ها در برابر حرارت نسبتاً مقاوم می باشند و قدرت سازگاری بالایی دارند. آفلاتوکسین از سموم قارچی طبیعی می باشد که از گونه‌هایی مانند *آسپرژیلوس فلاووس* (*Aspergillus flavus*) و *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* (*Aspergillu parasiticus*) منشاء می‌گیرند. این سموم اگر از راه مواد غذایی وارد بدن شوند می‌توانند سرطان زا باشند (۵).

انواع مختلفی از آفلاتوکسین‌ها وجود دارد مانند آفلاتوکسین B1 و B2 یا آفلاتوکسین G1 و G2. اهمیت مطالعات سم آفلاتوکسین به این خاطر می باشد که انسان با مصرف غذاهای آلوده در اثر رشد قارچ *آسپژیلوس* در معرض خطرات ناشی از سم قرار می گیرد. از آنجایی که جلوگیری از رشد قارچ ها در مواد غذائی آسان نیست، بنابراین پیشگیری از بیماری های قارچی در انسان وحیوان مشکل می باشد (٦ و ۷).

در سال ۱۹۸۸ آژانس بین المللی تحقیق بر روی سرطان، آفلاتوکسین B1 که یکی از شایع ترین سموم تولید شده توسط قارچ *آسپرژیلوس* می باشد را در لیست عوامل سرطان زای انسان قرار داد. ضررهای ناشی از مصرف آفلاتوکسین ها در انسان، از جمله محرز بودن نقش آفلاتوکسین B1 در وقوع سرطان و مقاوم بودن آفلاتوکسین M1 موجود در شیر در برابر استرلیزاسیون و پاستوریزاسیون، ضرورت چاره اندیشی در خصوص کنترل سموم قارچی به ویژه آفلاتوکسین ها را بیش از پیش نشان می دهد (۸ و ۹).

برای سنتز آفلاتوکسین توسط قارچ بیش از ۲۳ واکنش آنزیمی موثر در مسیر این سنتز دخالت دارد. تولید این سم طی برخی واکنش های اکسیداسیون و احیا صورت می گیرد. در مسیر سنتز این توکسین ۲۳ ژن مستقر در خوشه ژنی ۷۵ کیلو بازی دخالت دارد. اغلب این ژن ها توسط مسیر اختصاصی پروتئین متصل شونده به DNA کد شده توسط ژن *aflR* تنظیم می گردند (۱۰ و ۱۱).

پروتئین *AflR* به توالی پالیندرومی واقع در پروموتر بسیاری از ژن های موثر در بیوسنتز متصل شده و موجب افزایش رونویسی و سنتز آفلاتوکسین در قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* می شود. به عبارت دیگر *aflR* در نسخه برداری و تولید پروتئین آفلاتوکسین در قارچ های *آسپرژیلوس* نقش دارد (۱۲ و ۱۳).

گیاه رزماری (*Rosmarinus officinalis*) از خانواده نعناعیان (Lamiaceae) است که حداقل دارای ۱ درصد (حجم/وزن) روغن فرار می باشد. به صورت خوراکی در درمان اضطراب، سردرد، میگرن، فشار خون، نفخ و بی اشتهایی و به صورت موضعی به عنوان مسکن موضعی در درمان دردهای عضلانی و بیماری های روماتیسمی استفاده می شود. همچنین به دلیل عطر و طعم مناسب در صنایع آرایشی-بهداشتی مورد استفاده قرار می گیرد. روغن رزماری یک روغن محرک است و از نظر رایحه و اثر، گرم و نافذ می باشد. اثر محرک رزماری بر روی سیستم اعصاب مرکزی بسیار برجسته است. رزماری یکی از اجزای ترکیبات اصلی ضد قارچ های ساپروفیتی و درماتوفیتی می باشد. با این وجود، اثر رزماری همراه با دو روغن گیاهی دیگر و یک ترکیب استخراج شده از باکتری می باشد (١٦-١٤).

در سال ۲۰۱۳ مطالعه ای توسط لوپز ریز (Lopez-Reyez) و همکاران با هدف بررسی اثر عصاره الکلی رزماری و چند گونه دیگر گیاهی بر روی قارچ های ساپروفیتی انجام شد. محققین در این طرح از عصاره الکلی رزماری و درصد حجمی مشخص آن استفاده کردند. نتایج آنها نشان داد که اثرات ضد قارچی این عصاره ها که رزماری از اصلی ترین اجزای آن بود تا حد زیادی وابسته به غلظت و دفعات مصرف عصاره بر روی قارچ ها بود. همچنین در این مطالعه نشان داده شد که عصاره استخراج شده درصد حجمی بیشترین خاصیت ضد قارچی را دارد (۱۷).

در سال ۲۰۱۲ مطالعه ای با هدف بررسی نقش عصاره رزماری بر نابودی بیوفیلم های قارچی و میکروبی توسط چیفیروس (Chifirus) و همکاران انجام شد. یافته های آنها نشان داد که نانو ذرات مغناطیسی حاوی رزماری تاثیر زیادی در ممانعت از رشد بیوفیلم های قارچی دارند. همچنین تا حد زیادی بیوفیلم های قبلی تشکیل داده شده را نابود می کنند (۱۸).

هدف از این مطالعه بررسی خواص ضد قارچی عصاره گیاه رزماری در سه گروه قارچی *آسپرژیلوس فلاووس* (ساپروفیت)، *اپیدرموفایتون فلوکوزم* (*Epidermophyton floccosum*)، *ترایکوفایتون وروکوزوم* (*Trichophyton verrucosum*) (درماتوفیت) و *کاندیدا آلبیکنس* (*Candida albicans*) (مخمر) بود. همچنین حداقل غلظت موثر عصاره رزماری بر روی این قارچ ها و نیز بررسی اثرات این عصاره در بیان ژن آفلاتوکسین با روش Real time-PCR مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

الف) تهیه محیط کشت، عصاره رزماری و سویه های قارچی: محیط های کشت سابرودکستروز آگار و سابرو دکستروز براث از شرکت مرک آلمان خریداری شدند. همچنین عصاره رزماری از شرکت باریج اسانس کاشان به صورت استاندارد و مورد تایید وزارت بهداشت تهیه گردید. انواع جدایه های ایرانی و محیطی چهار قارچ *آسپرژیلوس فلاووس*، *اپیدرموفایتون فلوکوزوم*، *ترایکوفایتون وروکوزوم* و *کاندیدا آلبیکنس* از مرکز پژوهش ها و تحقیقات علمی کرج تهیه گردید. سویه ها در شرایط استریل به محیط سابرو دکستروزآگار و سابرو دکستروز براث اضافه شدند و در دمای ۳۰ درجه سلیسیوس قرار داده شدند. کلنی مخمر *کاندیدا آلبیکنس* و قارچ رشته ای *آسپرژیلوس فلاووس* تنها پس از چند روز و کلنی قارچ های درماتوفیتی *ترایکوفایتون وروکوزوم* و *اپیدرموفایتون فلوکوزوم* پس از چند هفته ظاهر شدند (۱۹ و ۲۰).

ب) ارزیابی خاصیت ضد قارچی عصاره رزماری: هر یک از قارچ های مورد نظر در مجاورت عصاره رزماری و هم بدون عصاره در محیط کشت قارچی کشت داده شدند. محیط کشت مناسب برای *آسپرژیلوس فلاووس* و *کاندیدا آلبیکنس* محیط سابرودکستروزآگار و محیط کشت موثر برای رشد درماتوفیت های *اپیدرموفایتون فلوکوزوم* و *ترایکو فایتون وروکوزوم* محیط مایکوسل آگار بود. برای ارزیابی فعالیت ضدقارچی عصاره رزماری از روش انتشار از دیسک استفاده شد (۲۰ و ۲۱). به طور خلاصه، ابتدا سوسپانسیون هر یک از قارچ های مورد نظر در آب مقطر تهیه گردید و غلظت آن با لوله شاهد نیم مک فارلند مطابقت داده شد. سپس به کمک سواپ پنبه ای از سوسپانسیون هر قارچ بر روی محیط های یاد شده به صورت فشرده کشت داده شدند. سپس دیسک های کاغذی استاندارد به عصاره رزماری خالص (با ماده موثر ۶/۳ میلی گرم ماده ۱ و ۸ سینئول در هر میلی لیتر) آغشته شدند و بر روی محیط کشت قرار گرفتند. محیط ها در دمای ۳۰ درجه سلیسیوس قرار داده شدند. موثر بودن عصاره رزماری و اثر بازدارندگی آن بر روی قارچ ها به صورت هاله های شفاف عدم رشد در اطراف دیسک ها مشاهده می گردد (۲۲ و ۲۳).

ج) تعیین حداقل غلظت بازدارنده عصاره (MIC): برای محاسبه حداقل تراکم بازدارندگی عصاره رزماری از ده لوله آزمایش استریل و استاندارد استفاده گردید. به تمامی لوله ها ۲ سی سی محیط سابرو دکستروز براث و ۱ سی سی سوسپانسیون قارچ مورد نظر اضافه گردید. در ادامه تنها به لوله اول ۱ سی سی از عصاره رزماری به عنوان ماده ضد قارچ اضافه شد. ماده موثر موجود در عصاره رزماری بر اساس وجود حداقل ۶/۳ میلی گرم ماده ۱ و ۸ سینئول در هر میلی لیتر از این عصاره ثبت گردید. در ادامه با افزودن یک سی سی از محتویات لوله اول به دوم و از لوله دوم به سوم و الی آخر عصاره رزماری رقیق گردید. لوله ها در دمای ۳۰ درجه سلیسیوس قرار داده شدند (۲۴ و ۲۵).

د) انجام RT-PCR بر روی قارچ آسپرژیلوس فلاووس: در ابتدا به منظور تخلیص RNA از نمونه های قارچی، از کیت Rapid Fungal RNA Extraction Kit شرکت Basic Bio کانادا و مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده استفاده گردید. به منظور بررسی کمی و کیفی mRNA استخراج شده از روش

اسپکتروفتومتری در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و توسط دستگاه بیوفوتومتر و الکتروفورز ژل آگارز استفاده گردید (۱ و ۱۰).

برای سنتز cDNA از کیت RevertAid^{TM} First Strand cDNA Synthesis Kit استفاده شد. به طور خلاصه، به میکروتیوب واجد RNA (با غلظت RNA (µg/ml) ۹۰-۵۰) که مرحله حذف آلودگی DNA را پشت سر گذاشته مقدار µg ۰/۵ پرایمر اضافه گردید و به مدت ۵ دقیقه در ºC ۷۰ گرماگذاری شد و سپس بلافاصله بر روی یخ قرار گرفت. در ادامه ٤ میکرولیتر از بافر 5X، ۲ میکرولیتر از dNTP mix (۱۰ میلی مولار) و ۲۰ واحد مهار کننده ریبونوکلئاز به آن اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در ºC ۳۷ قرار داده شد. سپس۲۰۰ واحد آنزیم RevertAidTM M-MuLV Reverse Transcriptase اضافه و به مدت یک ساعت در ºC ٤۲ انکوبه گردید. در نهایت برای توقف واکنش، نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه در ºC ۷۰ قرار گرفتند (۱۰ و ۲٦). برای انجام real time-PCR از کیت iScript^{TM} One-Step RT-PCR، SYBR$^{®}$ ساخت کمپانی BIORAD (cat No. 170-88) استفاده شد. از RNA تام به دست آمده از قارچ ها به طور مستقیم در این کیت استفاده گردید. محتوای این کیت شامل یک آنزیم ترانس کریپتاز معکوس، یک PCR Master Mix (شامل مخلوط dNTPs، آنزیم Taq DNA polymerase متصل به آنتی بادی، فلوئورسین و رنگ SYBR Green و پایدار کننده) می باشد. طبق برنامه PCR برای این کیت در دستگاه های Light Cycler (برنامه PCR) ابتدا تمامی مواد در غلظت های مناسب همراه با RNA تام استخراج شده از قارچ، در یک لوله ml ۰/۲ با یکدیگر مخلوط شدند و در دمای ºC ۵۰ به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند تا cDNA از RNA تام ساخته شود. در این مرحله آنزیم DNA Taq پلی مراز فعال نیست. زیرا به آنتی بادی خود متصل است. در ºC ۹۵ بعدی، همزمان با غیرفعال شدن آنزیم ترانس کریپتاز معکوس، آنتی بادی متصل به آنزیم Taq تخریب و Taq DNA polymerase برای شروع واکنش های پلی مریزاسیون DNA (از روی cDNA در حضور پرایمرهای اختصاصی خود) در دسترس قرار می گیرد. این همزمانی دو واکنش ساخت cDNA و تکثیر قطعه اختصاصی باعث حذف تمامی خطاهای مراحل بین RT-PCR و Quantitative PCR خواهد شد.

برای نرمال سازی (Normalization) مقادیر کمی mRNA در نمونه های قارچ لوله های رشد کرده در آزمونMIC، از ژن *β-اکتین* به عنوان یک ژن رفرنس استفاده شد. به منظور تکثیر ژن های *β-اکتین* و *aflR* از پرایمرهای طراحی شده از شرکت کاوش فن آوری کرج استفاده گردید (جدول ۱).

قبل از انجام هر گونه PCR در دستگاه Real Time و به منظور حصول اطمینان از عدم تشکیل باندهای غیراختصاصی در یک شرایط دمایی و غلظتی مطمئن ابتدا در دستگاه ترموسایکلر اپندروف ساخت کشور آلمان، شرایط دمایی مناسب و شرایط غلظتی برای پرایمرها به دست آمد و سپس طبق این شرایط بهینه شده واکنش PCR در دستگاه Real Time، اجرا شد. محصولات PCR حاصل از مرحله اول (بهینه سازی) با الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱ درصد در چندین مرحله دمایی و غلظتی برای قطعات مورد نظر آزمون و شرایط دمایی زیر برای تکثیر قطعه هدف (*aflR*) از mRNA و ژن *بتا اکتین*، مناسب تشخیص داده شدند (۲۷ و ۲۸).

جدول ۲ پس از چندین مرحله گرادیان دمایی (از ٥٤ تا ٦۲) و گرادیان های غلظتی از پرایمر ها به دست آمد. برای حصول اطمینان از عدم حضور باندهای غیراختصاصی از منحنی ذوب (Melting Curve) دستگاه و نیز الکتروفورز در ژل آگاروز ۱ درصد استفاده گردید.

٥) آنالیز کمی میزان بیان ژن aflR: از آنجایی که این مطالعه یک بررسی نسبی بیان بین لوله های واجد رشد قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* در آزمون MIC می باشد، تجزیه و تحلیل اطلاعات

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده برای بررسی میزان بیان *aflR*.

نام ژن	توالی	اندازه قطعه (جفت باز)
aflR	F: 5′-ATGGTAGCAGTAGCGTCTCC-3′ R: 5′ TTCCGTGTTCCATTGACTGC-3′	١٦٤
B-actin	F: 5′-CAAGAGATGGCCACGGCTGCT-3′ R: 5′-TCCTTCTGCATCCTGTCGGCA 3′	٢٨٤

جدول ۲: شرایط دمائی real time-PCR برای بررسی میزان بیان ژن ها

مرحله	دما (°C)	زمان	چرخه
واسرشت شدن	۹٤	۳۰ ثانیه	
اتصال	٦۰	۳۰ ثانیه	۳٥
گسترش	۷۲	۳۰ ثانیه	
گسترش نهایی	۷۲	۱۰ دقیقه	۱
	٤	-	

خام quantitative real time RT-PCR با روش pfaffl انجام شد. در این روش تغییرات بیان یک ژن خاص تحت شرایط مختلف در مقایسه با یک ژن رفرنس بر اساس فرمول زیر قابل ارزیابی است:

$$\text{Expression Ratio}=E_{\text{target}}^{(\text{Ct Control}-\text{Ct Target})} / E_{\text{Reference}}^{(\text{Ct Control}-\text{Ct Target})}$$

در این معادله E معرف کارآیی PCR و Ct شماره چرخه ای است که در آن منحنی تغییرات میزان فلورسانس هر نمونه خط آستانه را قطع می کند. با توجه به مطالب یاد شده برای آنالیز کمی میزان بیان ژن *aflR* بین لوله های دارای رشد *آسپرژیلوس فلاووس* در آزمون MIC ابتدا میزان کارایی PCR برای ژن *aflR* و نیز ژن *بتا-اکتین* به عنوان رفرنس، با استفاده از منحنی استاندارد اختصاصی برای هر ژن تعیین گردید. سپس میانگین Ct اختصاصی هر یک از قطعات (*aflR* و ژن *بتا-اکتین*) در لوله های واجد رشد *آسپرژیلوس فلاووس* در تست MIC به دست آورده شد و در معادله Pfaffl قرار داده شد. به این ترتیب میزان تغییر بیان ژن مورد نظر در گروه اصلی و گروه کنترل به دست آورده شد (۳۱-۲۹).

یافته ها

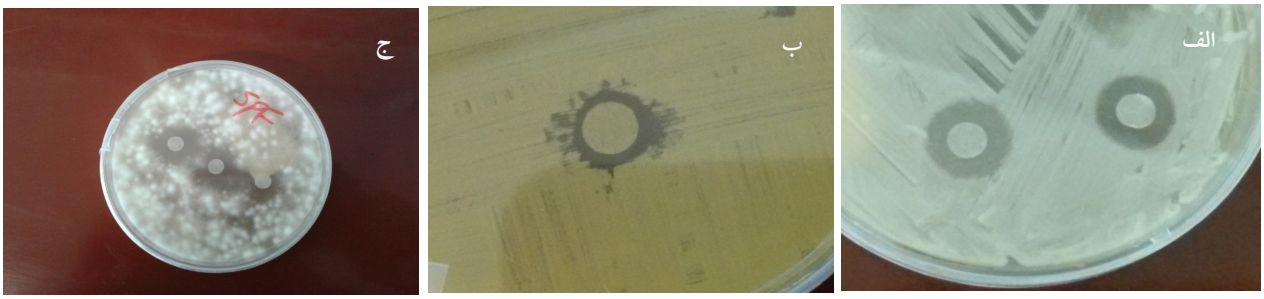
الف) ارزیابی خاصیت ضد قارچی عصاره رزماری: نتایج به دست آمده نشان داد که عصاره گیاه رزماری اثر بازدارندگی بسیار موثر و مطلوبی بر روی انواع قارچ ها از جمله قارچ های میسلیال، مخمری و درماتوفیتی دارد. به طوری که قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک های آغشته به رزماری حدود ۱٦ تا ۱۸ میلی متر تعیین گردید (شکل ۱).

ب) تعیین حداقل غلظت بازدارنده عصاره (MIC): نتیجه محاسبه حداقل غلظت بازدارندگی عصاره رزماری بر روی قارچ مخمری *کاندیدا آلبیکنس* حدود ٤ تا ٦ میلی گرم بر میلی لیتر، برای قارچ میسلیال *آسپرژیلوس فلاووس* حدود ۳ تا ٥ میلی گرم بر میلی لیتر و همچنین برای قارچ های درماتوفیتی *ترایکوفایتون وروکوزوم* و *اپیدرموفایتون فلوکوزوم* هم حدود ٤ تا ٦ میلی گرم بر میلی لیتر تعیین گردید.

ج) آنالیز کمی میزان بیان ژن aflR : نتایج بررسی های انجام شده برای آنالیز کمی میزان بیان ژن *aflR* در بین لوله های واجد رشد *آسپرژیلوس فلاووس* در آزمون MIC به صورت دوبلیکیت (دوتایی همزمان) آورده شده است.

۱- نتیجه تعیین بهره وری (efficiency) برای ژن *aflR* با استفاده از منحنی استاندارد:

شیب غلظتی cDNA به عنوان بهینه سازی (template) از ۱۰۰ الی ۰/۰۱ واحد می باشد. پارامترهای مهم حاصل از این منحنی عبارتند از (Efficiency= E=1, R^2=0.996 , M=-3.315) که E همان کارائی واکنش PCR و R^2 ضریب همبستگی بین رقت های استاندارد و M شیب خط استاندارد است.



شکل ۱: نتایج ارزیابی خاصیت ضدقارچی عصاره گیاه رزماری در برابر قارچ های مورد بررسی. الف) هاله شفاف عدم رشد قارچ *کاندیدا البیکنس* در اطراف دیسک رزماری، ب) هاله شفاف عدم رشد قارچ *آسپرژیلوس فلاووس*، ج) هاله شفاف عدم رشد قارچ درماتوفیتی.

معادله محاسبه E توسط نرم افزار دستگاه بدین شکل است: $E=10^{(-1/M)}$ -1 به عبارتی وقتی E=1 یعنی کارایی PCR ۱۰۰٪ است. اما در معادله pfaffl هنگامی که میزان محصول PCR در هر سیکل نسبت به سیکل قبلی ۲ برابر شود، کارایی PCR ۱۰۰٪ است. بنابراین، برای تبدیل E حاصل از نرم افزار Rotor-Gene 3000 به E قابل استفاده در معادله pfaffl، عدد ۱ با مقدار E ارائه شده توسط دستگاه جمع شد. یعنی وقتی E ارائه شده توسط نرم افزار دستگاه Rotor-Gene 3000 عدد ۱ باشد، این مقدار برای استفاده در معادله pfaffl برابر است با ۲ = (۱+۱) (شکل ۲).

۲- نتایج تعیین مقدار میانگین CT دو تست همزمان MIC در لوله های واجد رشد ٤ الی ۸ برای ژن *aflR*:

اطلاعات حاصل از این منحنی ها در پنجره Quant Resalts (شکل ۳) معرف مقدار CT (سیکلی از PCR که نشر فلورسنت حاصل از سایبرگرین از خط آستانه عبور می کند) برای قطعه *aflR* در لوله های ٤ تا ۸ که قارچ رشد کرده و به صورت دوبلیکیت همزمان انجام شده است. مقدار میانگین CT هر لوله در محاسبات مورد استفاده قرار می گیرد.

با جایگزین کردن اطلاعات در معادله:

$$\text{Expression Ratio}_{aflR} = E_{aflR}^{(Ct\ tube\ 8 - Ct\ tube7)} / E_{B\text{-}actin}^{(Ct\ tube8 - Ct\ tube7)}$$

تغییرات میزان بیان ژن *aflR* در لوله های واجد رشد قارچ در آزمون MIC به دست آمد. با توجه به میانگین تقریباً یکسان CT ژن *بتا- اکتین* در لوله های ۸ و ۷ و همچنین اختلاف کم میانگین CT ژن *aflR* در لوله های ۷ و ۸ نتیجه گرفته شد که تاثیر محسوس عصاره رزماری در مهار تولید افلاتوکسین و مهار بیان ژن *aflR* از لوله ۷ شروع شده و در لوله چهار علاوه بر مهار، بیان *aflR* افزایش CT ژن *بتا- اکتین* نیز اتفاق افتاده که همان غلظت بحرانی عصاره رزماری است. همچنین در لوله ۳ که غلظت عصاره افزایش یافته، به طور کامل مانع از رشد قارچ گردیده است. بنابراین، میزان مهار ژن *aflR* در حد فاصل غلظت های لوله های ٤ تا ۷ می باشد. میزان مهار با توجه به بی تاثیر بودن غلظت عصاره در لوله ۸ (به عبارتی تولید بدون مانع افلاتوکسین) به شرح زیربه دست آمد: میزان تغییرات بیان ژن *aflR* از لوله ۸ به ۷ برابر است با:

$\text{Expression Ratio}_{aflR}$= 3.58/1.006= 3.55 µg/ml

میزان تغییرات بیان ژن *aflR* از لوله ۸ به ٦ برابر است با:

$\text{Epression Ratio}_{aflR}$= 75.6/1.24= 60.51 µg/ml

میزان تغییرات بیان ژن *aflR* از لوله ۸ به ٥ برابر است با:

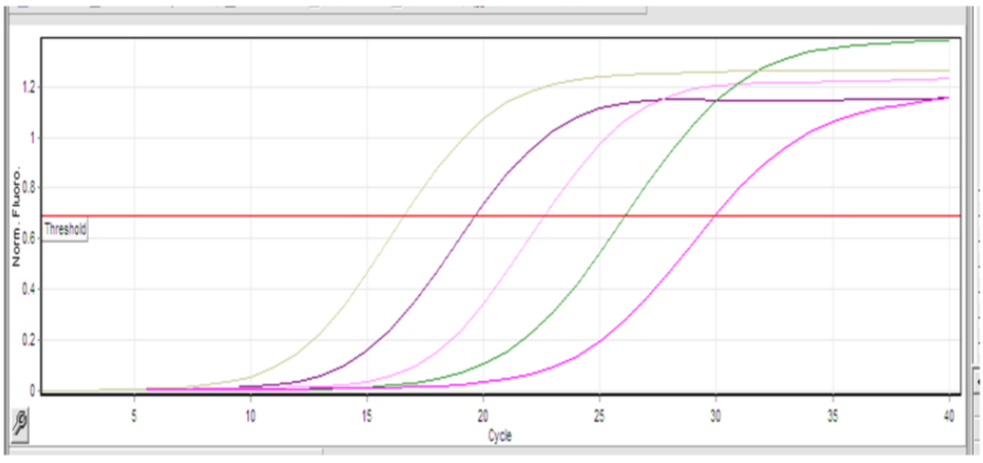
$\text{Expression Ratio}_{aflR}$= 133.43/2.24= 59.551 µg/ml

میزان تغییرات بیان ژن *aflR* از لوله ۸ به ٤ برابر است با:

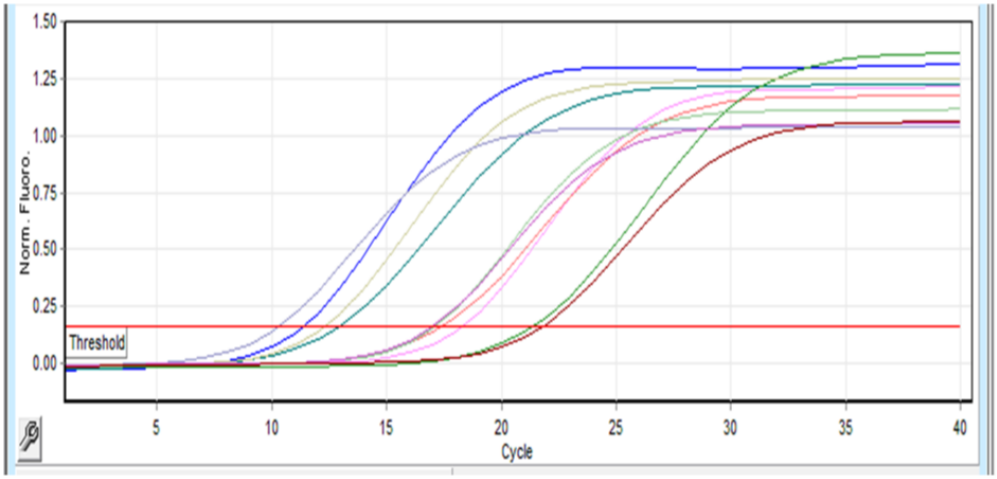
$\text{Expression Ratio}_{aflR}$= 1782.88/270.12= 6.6 µg/ml

بحث

آفلاتوکسین گروه بزرگی از مایکوتوکسین هاست که می توان آن را به عنوان سردسته تمامی مایکوتوکسین ها از جمله عوامل



شکل ۲: صفحه کاری نرم افزار Rotor-Gene پس از رسم منحنی استاندارد برای تکثیر *aflR*.



شکل ۳: میانگین CT دو تست همزمان MIC در لوله های واجد رشد ٤ الی ٨ برای ژن *aflR*.

سرطان زای قوی در میان ترکیبات شناخته شده طبیعی تاکنون در نظر گرفت. سمیت بالای آفلاتوکسین موجب شده در بسیاری از کشور های جهان مقادیر مجاز آن در مواد غذایی بسیار محدودتر گردد و توافقات صورت گرفته در کمیته های بهداشت جهانی مقدار مجاز این سموم را در هر کیلو گرم از مواد غذایی معادل ۱۵ میکرو گرم در نظر گرفته است (۳۳ و ۳٤).

امروزه استفاده از گیاهان دارویی و عصاره آنها به دلیل عدم عوارض جانبی، در دسترس بودن آنها و همچنین قیمت نسبتاً پایین آنها در حال گسترش است. تاکنون در جهان تحقیقات زیادی در مورد تاثیر عصاره های مختلف گیاهی به ویژه عصاره گیاه رزماری بر روی گروه های متعدد میکروبی صورت گرفته است. اما پژوهش کاملی که تاثیر این عصاره بر روی گروه های مختلف قارچی را بررسی کند انجام نشده است.

با توجه به محدود بودن و گران بودن داروهای ضد قارچی موجود در بازار به دلیل اثرات سوء شیمیایی و همچنین ایجاد مقاومت دارویی، بنابراین می توان به عصاره گیاه رزماری به عنوان یک داروی موثر ضد قارچی اعتماد داشت. از آنجایی که مصرف این عصاره هیچگونه تاثیر منفی از خود به جای نمی گذارد، می توان شرایط آزمایشگاهی برون تن (*In vitro*) را به شرایط بدن یا درون تن (*In vivo*) تعمیم داد (۳۷-۳۵). هدف از این تحقیق در مرحله اول بررسی تاثیر عصاره رزماری بر روی قارچ های رشته ای (*آسپرژیلوس فلاووس*)، قارچ های مخمری (*کاندیدا آلبیکنس*) و همچنین درماتوفیت ها (*ترایکوفایتون وروکوزوم* و *اپیدرموفایتون فلوکوزوم*) بود. سپس ضمن محاسبه حداقل غلظت باز دارنده موثر عصاره رزماری به تاثیر این عصاره در بیان ژن تولید کننده آفلاتوکسین در قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* به روش RT-PCR پرداخته شد.

نتایج این تحقیق در اکثر موارد با بررسی های گذشته هم خوانی دارد. به طوری که این پژوهش به خوبی اثر بازدارندگی عصاره رزماری هم در شرایط برون تن و هم در سطح مولکولی را بر روی انواع گروه های قارچی نشان داد. نتایج ما نشان می دهد که در سطح مولکولی بیان ژن موثر در تولید آفلاتوکسین در قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* تحت تاثیر عصاره رزماری مختل می گردد و تولید سم توسط قارچ کاهش و متوقف می شود.

تحقیقات گذشته تاثیر موثر عصاره های گیاهی را به غلظت موثر آنها وابسته می داند. به طوری که لوپز (Lopez) و همکاران در سال ۲۰۱۳ اثر عصاره رزماری را به غلظت موثر آن و همچنین تعداد دفعات تاثیر آن بر روی قارچ می دانند (۱۷). در مطالعه حاضر نیز تاثیر موثر عصاره رزماری به غلظت موثر آن وابسته بود. به طوری که با افزایش غلظت تاثیر بازدارندگی عصاره نیز افزایش می یافت. همچنین مقتدر (Moghtader) و همکاران در پژوهشی نشان دادند ترکیب کارنوسیک موجود در رزماری به طور بالقوه ای اثرات محافظتی در برابر سم

آفلاتوکسین ناشی از قارچ *آسپرزیلوس فلاووس* دارد. اما آنها دلیل این امر را بیان نکردند (۵). اما بررسی حاضر نشان داد که دلیل این امر می تواند تاثیر رزماری بر بیان ژن تولید کننده این سم باشد.

در مورد ژن تولید آفلاتوکسین و نحوه بیان آن نیز تحقیقاتی صورت گرفته است که در اکثر موارد با تحقیق پیش رو هم خوانی دارد. به عنوان مثال اشمیت هید (Schmidt Heydt) و همکاران در سال ۲۰۰۹ در آلمان اثر ترکیبات مختلف آب و دما در تنظیم بیان ژن های سنتز آفلاتوکسین *آسپرژیلوس فلاووس* را بررسی کردند. تجزیه و تحلیل ژن ها از طریق میکروآرایه و با استفاده از محیط کشت YES (Sucrose Extract Yeast) و برخی پارامترها انجام شد. در حالی که شرایط استرس القای ژن های سنتز کننده آفلاتوکسین B1 کم بود. اما تناسب بیان *aflJ* به aflR با افزایش سنتز آفلاتوکسین مرتبط بود (۳۸).

گالو (Gallo) و همکاران در سال ۲۰۱۰ تجزیه و تحلیل رونویسی ژن های تنظیمی اصلی بیوسنتز آفلاتوکسین *آسپرژیلوس فلاووس* به نام های *aflR* و *aflS* و پنج ژن ساختاری *aflM*، *aflD*، *aflP*، *aflO* و *aflQ* را بررسی کردند. همچنین تجزیه و تحلیل رشد قارچ را در دو محیط جداگانه شامل فندق آگار و YES انجام دادند. رونویسی تمام ژن ها مشابه سنتز آفلاتوکسین بود و پس از ۳۶ ساعت در محیط و YES و پس از ۷۲ ساعت در محیط فندق آگار تشخیص داده شدند. تولید سم در محیط فندق آگار در مقایسه با محیط YES به طور قابل ملاحظه ای کمتر بود. بیان دو ژن رمز گذاری لیپاز و یک متالوپروتئاز، که درگیر کاتابولیسم چربی و پروتئین هستند نیز در روند رشد قارچ مشاهده شد. نکته شایان توجه، بیان ژن متالوپروتئاز به طور خاص برای محیط فندق آگار صورت گرفت. در حالی که ژن لیپاز در هر دو محیط بیان شد. آنها در نهایت بیان سه ژن *ppoC*، *ppoB*، *ppoA* کدکننده اسید چرب دی اکسی ژناز/دیول سنتتاز موثر در بیوسنتز اکسی لیپین قارچ را تایید کردند (۳۹).

در سال ۲۰۰۵، اسکرم (Scherm) و همکاران سنجش توانایی تکنیک RT–PCR در تمایز بین زنجیره های آفلاتوکسین های مولد سم از غیرمولد سم در گونه های *آسپرژیلو س فلاووس* و *آسپرژیلوس پارازیتکوس* را بررسی نمودند. حداکثر ۱۳ رشته RNA بر روی دو محیط YES (مخمر–سوکروز) و YEP (مخمر–پپتون) به ترتیب با استفاده از پرایمرهای خاص بر اساس مناطق حفاظت نه ژن ساختاری (*aFIM*، *aflk*، *afII*، *afIH*، *afIG and afIQ*، *afID*، *afIP*، *afIo*) و دو ژن تنظیمی *aflR* و *aflS* مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین B1 رونویسی از طریق بیان ژن بتاتوبلین تایید شد. بیان اکثر ژن های بیوسنتز آفلاتوکسین شامل *aflR* و *aflS* همه رشته ها با توجه به تفاوت در محصولات آفلاتوکسین و شرایط رشد متفاوت بود. با این وجود آنها دریافتند که بیان سه ژن *aflO*، *aflD* و *aflP* همواره وابسته به توانایی رشته در واکنش به غلظت در طیف ۰/۱ تا ۶۰ میلی گرم بر میلی لیتر از کشت مشخص شده توسط فلورسنس HPLC است. همچنین یافته های آنها نشان داد که تکنیک RT–PCR به اندازه تکنیک cDNA در تشخیص سم زا بودن قارچ موثر است (۴۰).

گالو (Gallo) و همکارن در سال ۲۰۱۶، تاثیر دماهای مختلف (۳۷ ˚C، ۲۸ ˚C، ۲۰ ˚C) و نیاز آبی (۰/۹۰، ۰/۹۳، ۰/۹۹) را بر روی رشد محصول آفلاتوکسین BI و نیز بیان دو ژن تنظیمی *aflR* و *aflS* و دو ژن ساختاری *aflD* و *aflO* (بیوسنتز آفلاتوکسین) مربوط به *آسپرژیلوس فلاووس* را در محیط بادام آگار بررسی کردند. بیشترین تجمع زیستی قارچی و تولیدات آفلاتوکسینی در دمای ۲۸ درجه سلیسیوس و a ۰/۹۶ به دست آمد. هیچ رشد و یا محصول آفلاتوکسینی در خشک ترین شرایط آزمایش یعنی ۲۰ ˚C و (a ۰/۹۳ و ۰/۹۰) مشاهده نشد. در ۲۰ ˚C و ۳۷ ˚C تولید آفلاتوکسینی بسته به a، ۹۰–۷۰ درصد کمتر بود و یا به طور کامل متوقف شده است. با آزمون RT–PCR مشخص شد که دو ژن تنظیمی در کمینه محصولات آفلاتوکسینی و بیشینه دمایی بیان بالایی دارند. در مقابل دو ژن ساختاری در کمینه تولیدات آفلاتوکسینی بیان بالایی دارند (a ۰/۹۹–۰/۹۶ و ۲۸ ˚C). به نظر می رسد دما به عنوان عامل مهم در تولید محصول آفلاتوکسین وابسته به القای ژن های ساختاری بیوسنتز است (۴۱).

به طور کلی آنچه از این تحقیق استنباط می شود این است که شرکت های سازنده دارو به ویژه تولید کنندگان داروهای ضد قارچی می توانند با استناد به نتایج حاصل از این پژوهش، به کمک عصاره رزماری انواع پمادها و محلول ها را به منظور درمان بیماری های قارچی سطحی و جلدی و یا حتی فراتر از آن به شکل خوراکی و تزریقی برای درمان بیماری های قارچی زیر جلدی و احشایی ساخته و آن را ابتدا بر روی حیوانات و در مرحله بعد بر روی انسان ها مورد آزمون قرار دهند.

نتیجه گیری

نتایج این پژوهش اثرات مهاری و بازدارندگی عصاره گیاه رزماری در بیان ژن *AFL1* کد کننده آفلاتوکسین در قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* را نشان داد. همچنین در سطح مولکولی امکان ارزیابی میزان تاثیر این عصاره نشان داده شد و مشخص شد که میزان این اثر به غلظت موثر آن بستگی دارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از جناب آقایان دکتر هاشمی، دکتر رضایی، دکتر بیات، دکتر هخامنشی و دکتر علیزاده به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Rashin M, Ayat Nasrollahi O, Norbakhsh F, Rezaie S, Hosseinjani H. A survey of the effect of licorice plant extract on *aflR* gene expression aflatoxin production in *Aspergillus paraziticus* via Real-time PCR. Modares J Med Sci. 2012; 15(3): 63-77.
2. Eaton DL, Groopman JD. The toxicology of aflatoxins. Academic Press New York. 1994: 383-426.
3. Nabili M, Moazeni M, Taghizadeh Armaki M, Asgari MR, Nosrati A, Shokohi T. Diagnostic tools in fungal infections since classical to molecular era. J Mazandaran Univ Med Sci. 2013; 23(104): 109-129.
4. Khan R, Islam B, Akram M, Shakil S, Ahmad AA, Ali SM, Siddiqui M, Khan AU. Antimicrobial activity of five herbal extracts against multi drug resistant (MRD) strains of bacteria and fungus of clinical origin. Molecules. 2009; 14: 586-597.
5. Moghtader M, Salari H, Farahmand A. Evaluation of the antifungal effects of the rosemary oil and comparison whit synthetic borneol and funjicide on the growth of *Aspergillus flavus*. J Ecol Natural Environ. 2011; 3(6): 210-214.
6. Rota C, Carraminana JJ, Burillo J, Herrera A. In vitro antimicrobial activity of essential oils from aromatic plans against selected foodborne pathogens. J Food Prot. 2004; 67: 1252-1256.
7. Flamini G, Cioni PL, Morelli I, Macchia M, Ceccarini, L. Main agronimic-productive characteristics of two ecotypes of *Romarinus officinalis* L. and chemical composition of their essential oils. J Agr Food Chem. 2002; 50: 3512-3517.
8. Couladis M, Tzakou O, Verykokidou E. Screening of some Greek aromatic plants for antioxidant activity. J Phytother Res. 2003; 17: 194-196.
9. Huang MT, Wang ZY, Ferraro T, Lou YR, Stauber K, Georgiadis C, Laskin JD, Conney A. Inhibition of skin tumorigenesis by rosemary and its constituents carnosol and ursolic acid. Cancer Res. 1994; 54: 701-708.

10. Yu J, Chang PK, Ehrlish KC, Cary JW, Bhatnagar D, Cleveland TE, Payne GA, Linz JE, Woloshok CP, Bennett JW. Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. Appl Environ Microbial. 2004; 70(3): 1253-1262.

11. Jamali A. Expression of aflatoxin genes aflO (omtB) and aflQ (ordA) differentiates levels of aflatoxin production by *Aspergillus flavus* strains from soils of pistachio orchards. Res Microbiol. 2013; 64: 293-299.

12. Yu J, Mohawed SM, Bhatnagar D, Cleveland TE. Substrate-induced lipase gene expression and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. J Appl Microbiol. 2003; 95(6): 1334-13420.

13. El-Nagerabi S, Al-Bahry SN, Elshafie A, Al Hilali S. Effect of *Hibiscus sabdariffa* extract and *Nigella sativa* oil on the growth and aflatoxin B1 production of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus rasiticus* strains. Food Cont. 2012; 25(1): 59-63.

14. Sienkiewicz M, Pastuszka M. The potential of use uasil and Rosemary essential oils as effective antibacterial agent. Molecules. 2013; 18: 9334-9351.

15. Moreno S, Vojnov A. Antioxidant and antimicrobial activities of rozemary extracts linked to their polyphenol composition. 2006; 40(2): 223-231.

16. Petersen M, Simmonds MSJ. Rosmarinic acid. Phytochem. 2003; 62: 121-125.

17. Lopez-Reyes JG, Spadaro D, Garibaldi A, Gullino ML. Efficacy of plant essential oils on postharvest control of rots caused by fungi on different stone fruits in vivo. J Food Prot. 2013; 76(4): 631-639.

18. Chifiriuc C, Gumezescu V, saviue C, Lazar V, Andronescu E. Hybrid magnetite nanoparticles/ *Rosmarinus officinalis* essential oil nanobiosystem with antibiofilm activity. Nanoscale Res Lett. 2012; 7: 209.

19. Crawford JM, Kumar V. Liver and biliary tract. Pathologic basis of disease ed. Elsevier Saundres. Philadelphia. 2005; p: 924.

20. Espinel-Ingroff AV, Pfaller MA. Susceptibility test methods; yeasts and filamentous fungi. In Manual of clinical microbiology. 9th ed, Murray. ASM Press. Washington. 2007; p: 1972.

21. Masuda T, Inaba Y, Maekawa T, Takeda Y, Tamura H, Yamaguchi H. Recovery mechanism of the antioxidant activity from carnosic acid quinine, an oxidized sage and rosemary antioxidant. J Agric Food Chem. 2002; 50: 5863-5869.

22. Farzaneh M, Ahmadzadeh M, Hadian J, Tehrani AS. Chemical composition and antifugal activity of the essential oils of three species of Artemisia on some soil-borne phytopathogens–commun Agric. Apple Biol Sci. 2006; 71(3): 1327-1333.

23. Lopez-Malo A, Barreto-Valdivieso J, Palou E, Martin FS. *Aspergillus flavus* growth response to cinnamon extract and sodium benzoate mixtures. Food Control. 2007; 18(11): 1358-1362.

24. Scorzoni L, Benaducci T, Almeida AMF, Silva DHS, Bolzani VS, Mendes-Giannini MJS. Comparative study of disk diffusion and micro-dilution methods for evaluation of antifungal activity of natural compounds against medical yeasts *Candida* spp. and *Cryptococcus* sp. Rev

Cienc Farm Basica Apl. 2007; 28: 25-34.

25. Santoyo S, Cavero S, Jaime L, Ibanez E, Senorans FJ, Reglero G. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. J Food Prot. 2005; 68(4): 790-795.

26. Watson AJ, Fuller LJ, Jeenes DJ, Archer DB. Homologs of aflatoxin biosynthesis genes and sequence of *aflR* in Asperjillus oryzae and *Aspergillus sojae*. App Environ Microbial. 1999; 65 (1): 307-310.

27. Iu Y, Zu Y, Chen L, Shi X, Wang Z, Sun S, Efferth T. Antimicrobial activity of clove and Rosemary essential oils alone and in combination. Phytother Res. 2007; 21: 989-994.

28. Pyun MS, Shin S. Antifungal effects of the volatile oils from Allium Plants against *Trichophyton* species and synergism of the oils with ketoconazole. Phytomedicine. 2006; 13: 394-400.

29. Yusuke Matsuzaki T, oshiyuki T, Tatsuji N. Antifungal activity of chimotype essential oil from Rosemary against *Candida albicans*. Open J Stomatol. 2013; 3: 176-182.

30. Golshani Z, Davoodi V. Invitro study of antimicrobial effects of *Rosemarinus officinalis* leaf extract against some pathogens. Arak Med Univ J. 2013; 16(8): 82-89.

31. Inouye S, Uchida K, Nishiyama Y, Hasumi Y, Yamagushi H, Abe S. Combined effect of heat, essential oils and salt on the functional activity against *Trichophyton mentagrophytes* in foot bath. Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi. 2007; 48: 27-36.

32. Pauli A. Anticandidal low molecular compounds from higher plants with special reference to compounds from essential oils. Med Res Rev. 2006; 26: 223-268.

33. Celiktas OY, Hames KEE, Bedir E, Vardar SF, Ozek T, Baser KHC. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. Food Chem. 2007; 100(2): 553-559.

34. Omidbeygi M, Barzegar H, Hamidi Z, Naghdibadi H. Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. Food Control. 2007; 18: 1518-1523.

35. Nusier M, Batineh H, Daradkah H. Adverse effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) on reproductive function in adult male rats. Exp Biol Med (Maywood). 2007; 232: 809-813.

36. Cheung S, Tai J. Anti-proliferative and antioxidant properties of rosemary *Rosmarinus officinalis*. Oncol Res. 2007; 17(6): 525-531.

37. Salem M, Zidan Y. Antifungal activities of two essential oils used in the treatment of three commercial woods deteriorated by five common mold fungi. Int Biodeterior Biodegred. 2015; 106: 96-98.

38. Schmidt-Heydt M, Abdel-Hadi A, Magan N, Geisen R. Complex regulation of the Aflatoxin biosynthesis gene cluster of *Aspergillus flavus* in relation to various combinations of water activity and temperature. Int J Food Microbiol. 2009; 135(3): 231-237.

39. Gallo A, Epifani F, Bonsegna S, Pascale M, Santino A, Perrone G. Analysis of genes early expressed during *Aspergillus flavus* colonization of hazelnut. Int J Food Microbiol. 2010; 137: 111-115.

40. Scherm B, Palomba M, Serra D, Marcello A, Migheli Q. Detection 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*. Int J Food Microbiol. 2005; 98(2): 201-210.

41. Gallo A, Solfrizzo M, Epifani F, Panzarini G, Perrone G. Effect of temperature and water activity on gene expression and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus* on almond medium. Int J Food Microbiol. 2016; 217: 162-169.

Journal of Microbial World
Volume 11, No. 1, April 2018

Original Article

Assessment of antifungal activity of Rosemary oil extract and its effect on *AFL1* gene expression in *Aspergillus flavus* by Real-Time PCR

Mojtaba Mohammadi[1], Seyed Jamal Hashemi[2], Sasan Rezaie[3], Mansour Bayat[4]

[1]Ph.D. student, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. [2] Professor, Department of Medical Mycology, Faculty of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.[3] Professor, Department of Medical Mycology, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. [4]Professor, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Rosemary is a very important medicinal herb which its effect on toxin-causing and pathogenic fungi is not studied very well. This study was aimed to investigate the antifungal effect of the extract of Rosemary extract on various fungal groups including *Aspergillus flavus*, *Candida albicans*, *Epidermophyton floccussom*, *Trichophyton verrucosum* and its effect on *AFL1* gene expression in *A. flavus* using real-time PCR method. Achieving an effective herbal medicine can be significant due to the limited amount of antifungal drugs and the prevalence of antifungal drug resistance.

Materials & Methods: First of all *A. flavus* and *C. albicans* were cultured on sabouraud dextrose agar (SDA) media and *T. verrucosum* and *E. floccosum* were cultured on Mycocell agar media with 0.5 McFarland turbidity standard. Antifungal property of the rosemary extract was investigated using disk diffusion test. Then, the effective Rosemary extract concentration was evaluated using 10 standard tubes and sabouraud dextrose broth. Finally, the effect of Rosemary extract on *AFL1* gene expression was examined.

Results: Our results indicated that Rosemary extract has an inhibitory effect on various types of fungi so that the mean diameter of the inhibition zone was measured as about 16 to 18 mm. The effective MCI for *C. albicans* was observed as approximately 4 to 6 mg / L, for *A. flavus* as 3 to 5 mg /L and for *E. floccosum* and *T. verrucosum* as 4 to 6 mg /L. RT-PCR analysis confirmed the inhibitory effect of Rosemary extracts on aflatoxin- producing *AFL1* gene expression at the molecular level, very well.

Conclusion: The extract of Rosemary can have a considerable inhibitory effect on fungal growth, *AFL1* gene expression and aflatoxin production in *A. flavus.*

Keywords: Medical plants, *Aspergillus flavus, Epidermophyton floccosum, Trichophyton verrucosum, Candida albicans.*

Correspondence to: Seyed Jamal Hashemi

Tel: +98 9121009141

E-mail: sjhashemi@tums.ac.ir

Journal of Microbial World 2018, 11(1): 88-100.