فصلنامه (علمی – پژوهشی)

زیست شناسی تکوینی

سال سیزدهم، شماره ۳، تابستان ۱۴۰۰ ص. ۱۴-۱

مقاله پژوهشی

مطالعه ماکروسکوپی و میکروسکوپی اثرات ضدقارچی آلکالوئید، فنل و اسانس شاتره ایرانی (*Fumaria vaillantii*) بر آسپرژیلوس فلاوس (*Aspergillus flavus*) و آسپرژیلوس نیگر (*A. niger*)

منیر محسنی[۱]، عذرا عطائی عظیمی[۲*]، بابک دلنواز هاشملویان[۲] و مژگان فرزامی سپهر[۲]

[۱] دانشجوی دکترا، گروه زیست شناسی، دانشکده کشاورزی، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی ،ساوه ، ایران

[۲] دانشیار گروه زیست شناسی، دانشکده کشاورزی، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی ،ساوه ، ایران

[*](نویسنده مسئول مکاتبات): baharana1395@gmail.com

تاریخ دریافت: تیر ۱۴۰۰ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۴۰۰

چکیده

شاتره ایرانی (*Fumaria vaillantii*) از تیره فوماریاسه (Fumariceae) گیاهی سرشار ترکیبات ثانوی با اثرات دارویی مختلف است. آلکالوئید، فنل و اسانس شاتره برای سنجش فعالیت ضد قارچی، استخراج شدند. عصاره خام اتانولی از شاخساره در زمان گلدهی به دست آمد. از عصاره خام برای جداسازی فراکشن‌های آلکالوئیدی و فنل استفاده شد. آلکالوئید در چهار فراکشن جدا گردید. اسانس با دستگاه کلونجر استخراج شد. آسپرژیلوس فلاوس (*Aspergillus flavus*) و آسپرژیلوس نیگر (*A. niger*) از انستیتوپاستور ایران تهیه شد. نمونه‌های آسپرژیلوس (قطر دیسک ۵ میلی‌متر) در محیط‌های محتوی پوتیتیو دکستروز آگار و مقادیر مختلف عصاره‌های فنلی، آلکالوئیدی و اسانس کشت شدند. ریسه‌های آسپرژیلوس‌ها در کشت کنترل (غلظت صفر) و کشت‌های تیمار شده با عصاره‌های فنلی، آلکالوئیدی و اسانس با میکروسکوپ نوری و میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) مورد مطالعه قرار گرفتند. اثر ضد آسپرژیلوسی عصاره فنلی، آلکالوئید و اسانس شاتره ایرانی روی فلاوس و نیگر شدید بود. هر دو غلظت هر سه عصاره، مهار کننده رشد قارچ بودند. نتایج میکروسکوپ معمولی و نگاره الکترونی نشان داد که عصاره‌های شاتره ایرانی روی ساختمان سلولی ریسه قارچ اثر کرده و باعث نازک شدن و شکستن دیواره‌ها، پلاسمولیز و وزیکوله شدن سلول‌های برخی از ریسه‌ها، مانع رشد و القای مرگ قارچ می‌شوند. عصاره‌های فنلی، آلکالوئیدی و اسانس گیاه شاتره ایرانی فعالیت ضد قارچی مشابه بر هر دو گونه آسپرژیلوس داشتند. شاتره ایرانی گیاهی سرشار از ترکیبات فنلی، آلکالوئید و اسانس با اثرات ضد قارچی است.

کلیدواژه‌ها: آلکالوئید، ضدقارچ، آسپرژیلوس، شاتره، فنل.

مقدمه

شاتره ایرانی (*Fumaria vaillantii* Loise) گیاهی کوچک، یک ساله با برگ‌های بریده بریده و گل‌هایی صورتی رنگ است که در ایران با عناوین شاتره و شاهتره شناخته می‌شود [۱]. این گیاه دارویی در طب سنتی برای عرق آوری و ادرارآوری، ضد انگل، شل کننده عضلات و تمیز کردن خون در کبد استفاده می‌شود [۲]. گیاهان تیره شاتره دارای آلکالوئید، ترکیبات فنلی و اسانس با فعالیت زیستی هستند [۳]. شاتره‌ها به ویژه شاتره ایرانی غنی از ایزوکواینولین آلکالوئید هستند [۴]. ایزوکینولین‌ها، گروه بزرگی از آلکالوئیدها مانند انواع پروتوبربرین، آپروفین، پروتوپین و بنزوفنانتریدین هستند [۵]. پروتوبربرین‌ها شامل چهار گروه ۱- آلکالوئیدهای غیربازی و ترکیبات چربی دوست، ۲- آلکالوئیدهای کوارتری بنزوفنانتریدین و پروتوپین، ۳- آلکالوئیدهای کوارترناری پروتوبربرین و ۴- ترکیبات قطبی و آلکالوئیدهای کوارترناری به شدت قطبی از گیاهان تیره‌های شقایق، زرشک، شاتره و برخی تیره‌های دیگر جدا و شناسایی شده‌اند [۶]. خواص دارویی و برخی از فعالیت‌های زیستی شاتره‌ها به دلیل داشتن ایزوکواینولین آلکالوئید است [۷]. برخی از گونه‌های شاتره غنی از ترکیبات فنلی با فعالیت آنتی اکسیدانی بالا هستند [۸]. فنل‌ها ترکیباتی هستند که بسیاری از آن ها، توان ضد قارچی بالایی دارند [۹]. آسپرژیلوس‌ها از آسکومیست‌های ناقص، فراوانترین قارچ‌ها در دنیا و نقش‌های متفاوتی در زندگی انسان دارند [۱۰]. برخی از آسپرژیلوس‌ها مواد قارچی سمی (میکوتوکسین) تولید می‌کنند که برای انسان و جانوران سمی هستند [۱۱]. برخی آسپرژیلوس‌ها مانند آسپرژیلوس فلاووس (*Aspergillus flavus*) سمومی تولید می‌کنند که اکثرا سرطانزا هستند [۱۲]. آسپرژیلوس فلاوس با آلوده کردن غذاها و دانه ها، در آن‌ها مایکوتوکسین و آفلاتوکسین تولید می‌کنند که سرطانزا هستند [۱۳،۱۰]. آسپرژیلوس نیگر (*A. niger*) یکی از مهمترین میکروارگانیسم‌ها در بیوتکنولوژی است. از این قارچ برای تولید آنزیم‌های تجزیه کننده مواد مختلف و تولید تجاری اسید سیتریک استفاده می‌شود [۱۱،۸]. بسیاری از آلکالوئیدها [۱۴] و فنل‌ها [۱۵] اثر ضد قارچی دارند [۱۳]. ترکیبات فنلی به جهت ساختار مولکولی خاصشان توانایی نفوذ و انتشار از خلال غشاهای میکروبی و ورود به درون سلول قارچ را دارند [۱۵]. ترکیبات فنلی برخی جلبک ها، با اثر روی ارگواسترول غشای قارچ، باعث تخریب غشا و مهار تبادل مواد می‌شود [۴]. پروتئین‌ها از عوامل محرک رشد در برخی از جنس‌های قارچ‌ها هستند [۱۶]. برخی از ترکیبات فنلی مثل تانن‌ها با پروتئین‌های قارچ‌ها ترکیب می‌شوند، اثر سمی خود را روی سلول‌ها نشان می‌دهند [۱۷].

مواد و روش‌ها

شاتره ایرانی(*Fumaria vaillantii*) از بخش مرکزی ساوه (34°:45' to 35°:34' north and 49°: 15' to 50°:56' east)، جمع‌آوری و سه گیاه کامل از آن جهت شناسایی به مرکز هرباریوم منتقل گردید. پس از شناسایی، کدگذاری (S.IAU-8631) و در هرباریم مرکزی ساوه ذخیره شد.

گیاهان جمع شده برای آزمایش پس ازشستشو در سایه خشك، پودر و برای استخراج آماده گردیدند.

استخراج عصاره خام: ابتدا ۵۰۰ گرم پودر نمونه گیاهی با۲۵۰۰ میلی لیتر الکل اتیلیك ۹۶% به مدت ۱۲ساعت خیسانده، بعد به مدت ۴ ساعت در بن ماری ۶۰ درجه سانتی گراد قرارداده و در نهایت با کاغذ صافی، صاف شد. عصاره با دستگاه تبخیر در خلأ خشك و به دو قسمت (یک قسمت برای جداسازی آلکالوئید و یک قسمت جداسازی فنل و ترپن) تقسیم و در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید [۱۸].

جدا سازی گروه‌های آلکالوئیدی [۱۹]: جداسازی تیپ‌های مختلف آلکالوئید از عصاره خشک باحلال‌های مختلف و مرحله به مرحله (روش اسید- باز) انجام گرفت (هر مرحله سه بار تکرار شد).

۱- (فراکشن ۱)، جداسازی آلکالوئیدهای محلول درلیپید (لیپوفیل)وآلکالوئیدهای غیربازی: عصاره خشك در ۲۵۰ میلی‌لیتر آب حل شد. بعد از آنکه pH با اسیدسولفوریك غلیظ به حدود ۴-۳ رسانده شد، به آن ۲۰۰

میلی لیتر اتر اتیلیک اضافه بعد از هم زدن، فاز اتری دارای آلکالوئیدهای محلول درلیپید (لیپوفیل) وآلکالوئیدهای غیربازی با دکانتور جداگردید. فاز اتری بعد از خشک شدن با دستگاه تبخیر در خلأ خشک و برای آزمایش‌های بعدی در فریزر دمای ۸۰- سانتی گراد نگهداری شد.

۲- (فراکشن ۲)، جداسازی آلکالوئیدهای بنزوفنانتریدین چهاربخشی، آلکالوئیدهای پروتوپین و آلکالوئیدهای سه قسمتی بازی محلول دراتر: pH فازآبی اسیدی باقیمانده ازمرحله ۱ را با اضافه کردن کربنات سدیم به حدود ۸-۱۰رسانده، سپس به آن ۲۰۰ میلی‌لیتر اتر اضافه ودرون دکانتور ریخته، فاز اتری جداگردید. فاز اتری دارای آلکالوئیدهای بنزوفنانتریدین‌های چهاربخشی، آلکالوئیدهای پروتوبین وآلکالوئیدهای سه قسمتی بازی محلول در اتر بود که خشك شد و برای آزمایش‌های بعدی در فریزر دمای ۸۰- سانتی گراد نگهداری شد.

۳- (فراکشن ۳)، استخراج آلکالوئیدهای چهار پروتوبربرین به شکل نمك‌های سیترات وترکیبات غیرقطبی:

pH فاز آبی باقیمانده ازمرحله ۲را با اضافه کردن سود ۲ نرمال به بالاتر از ۱۳رسانده، سپس با اضافه کردن قطره قطره اسیدسیتریك اشباع، pH به ۱۰-۸ رسانده شد. سپس به آن ۲۰۰ میلی‌لیتر اتر اضافه و با دکانتور فاز اتری جداگردید. فاز اتری محتوی آلکالوئیدهای چهار پروتوبربرین به شکل نمك‌های سیترات وترکیبات غیرقطبی، خشك و برای آزمایش‌های بعدی در فریزر دمای ۸۰- سانتی‌گراد نگهداری شد.

۴- (فراکنش ۴)، استخراج آلکالوئیدهای چهاربخشی باقطبیت بالا: pH فاز آبی باقیمانده ازمرحله ۳ با اضافه کردن محلول محتوی اسیدسولفوریك + یدورپتاسیم اشباع (KI) به ۵/۵ رسانده شد. سپس به آن ۲۰۰میلی‌لیتر کلروفرم اضافه و فاز کلروفرمی با دکانتور جدا گردید. فاز کلروفرمی محتوی آخرین آلکالوئیدهای چهاربخشی باقطبیت بالا، بود که خشك و برای آزمایش‌های بعدی در فریزر دمای ۸۰- سانتی گراد نگهداری شد.

جداسازی فنل از عصاره شاتره ایرانی [۲۰]: عصاره خشك شده با ۱۰۰میلی‌لیترآب جوش اسیدی (تنظیم pH= ۴ آن با اسیدسولفوریك) حل، بعد با ۱۰۰ میلی لیتر اتر مخلوط و بخش اتری با دکانتور جدا و دور ریخته شد (سه بار تکرار). بعد از تنظیم pH عصاره آبی با هیدروکسیدسدیم روی ۶، با ۱۰۰ میلی لیتر اتر مخلوط و فاز اتری محتوی فنل با قیف دکانتور جدا شد. فاز اتری خشك و برای آزمایش‌های بعدی در فریزر دمای ۸۰- سانتی گراد نگهداری شد.

اسانس: ۵۰ گرم پودر گیاه با۲۵۰ میلی‌لیتر آب مخلوط و اسانس آن با دستگاه کلونجر در با دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد، به مدت ۲۴ساعت جدا و در یک ویال شیشه ای نگهداری شد.

تهیه قارچ: آسپرژیلوس نیگر (*Aspergillus niger*) کد ۵۰۱۰۱ و شناسنامه ۹۱۴۲- ATCC وآسپرژیلوس فلاووس (*A. flavus*) کد ۵۰۰۴۱ و شناسنامه AR-۱۱۱ از انیستیتو پاستور تهران بانک زیستی قارچ‌های بیماریزای ایران (PFCC)تهیه گردید.

کشت قارچ در تیمارهای عصاره‌های آلکالوئیدی، فنلی و اسانس: به محیط‌کشت قارچ (۳۹ گرم در لیتر پوتیتو دکستروزآگار) مقادیر ۰، ۰/۰۸ و ۰/۱۲ میلی‌گرم در میلی لیتر، از هر عصاره به طور جداگانه اضافه شد. بعد از استریل کردن (۱۵ دقیقه اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار یک اتمسفر) و ریختن در پتری دیش و سرد شدن در دمای اتاق، سه قطعه (قطر ۱ میلی‌متر) از کلنی قارچ برداشته و در سه بخش محیط با فاصله مساوی کشت شد. نمونه‌های کشت شده در انکوباتور ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت قرار داده شد. بعد از این زمان قطر هاله رشد قارچ اندازه گیری شد. هر آزمایش ۳-۵ بار تکرار داشت.

برای مطالعه قارچ با میکروسکوپ نوری معمولی (Zeiss 2005B) بعد از ۷۲ ساعت تیمار قارچ‌ها با عصاره‌ها، از ریسه‌های قارچ با نوک سوزن نمونه برداری و روی لام با یک قطره رنگ آبی آنیلین ۱% مخلوط شدند. بعد از ۳۰ ثانیه حرارت ملایم با شعله و گذاشتن لامل با میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی‌های مختلف مطالعه شد.

برای مطالعه با میکروسکوپ الکترونی نگاره، بلوک‌هایی به قطر ۳ میلی‌متر از ریسه‌های قارچ، روی یک چسب نواری

دو رو قرار و چسب نواری با قارچ درون یک پتری استریل در دیسکاتور گذاشته شد تا خشک شود. قبل از عکسبرداری با یک دستگاه پوشش دهنده، سطح نمونه‌ها با روپوستی به قطر ۱۵۰ نانومتر پوشش و با میکروسکوپ الکترونی نگاره مدل MIRA3 ساخت شرکت TESCAN عکسبرداری و مطالعه شد.

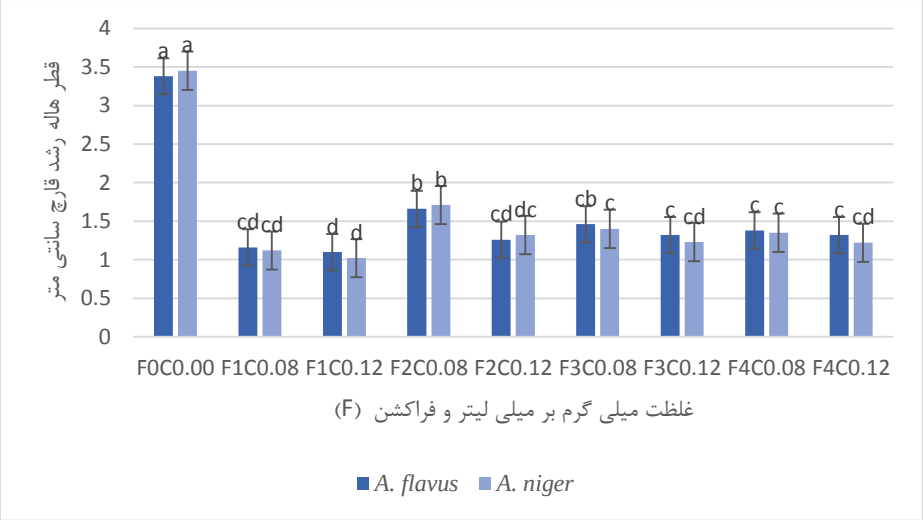
تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: محاسبه واریانس یک طرفه با نرم‌افزار مینی تب (Minitab) و به دنبال آن محاسبه میانگین‌ها با نرم‌افزار توکی (Tukey) انجام گرفت. اختلاف میانگین در سطح ۰/۰۵ و۰/۰۱ ≥p معنادار در نظر گرفته شد.

نتایج

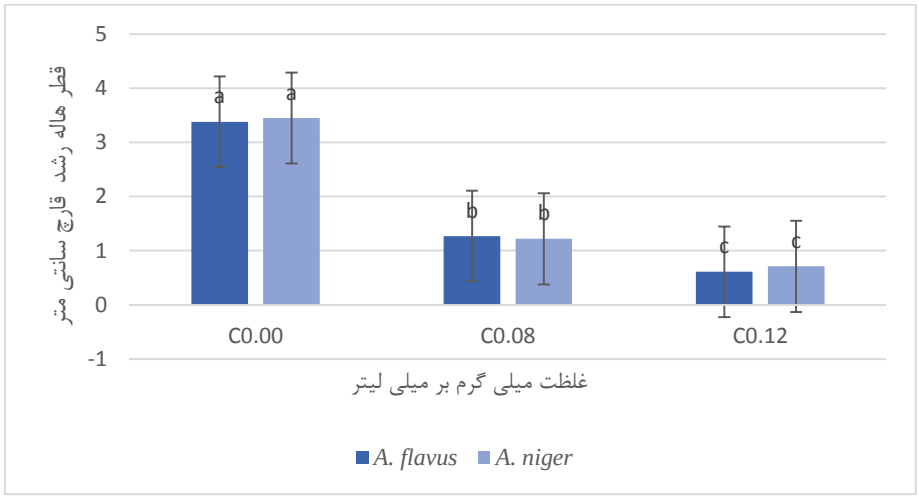
اثرات ماکروسکوپی

آلکالوئید: همه انواع آلکالوئید در فراکشن‌های آلکالوئیدی با اختلاف معنی‌دار با شاهد (F0C0.00) رشد هر دو قارچ را مهار کردند (شکل ۱). اثر ضد قارچی فراکشن ۱ در هر دو غلظت بیشتر از فراکشن‌های دیگر و غلظت ۰/۰۸ میلی‌گرم در لیتر فراکشن ۲، کمترین اثر را داشت.

فنل: عصاره فنلی شاتره ایرانی در هر دو غلظت با اختلاف معنی دار نسبت به شاهد، اثر بازدارنده روی رشد هر دو گونه آسپرژیلوس داشت (شکل ۲). این اثر با افزایش غلظت به طور معنی‌داری افزایش داشت.



شکل ۱- مقایسه اثر غلظت‌های ۰، ۰/۰۸ و ۰/۱۲ میلی‌گرم در میلی لیتر (C) فراکشن‌های آلکالوئیدی (F1-F4) بر رشد آسپرژیلوس فلاوس و نیگر.



شکل ۲- مقایسه اثر غلظت‌های ۰، ۰/۰۸ و ۰/۱۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (C) عصاره فنلی شاتره ایرانی بر رشد آسپرژیلوس فلاوس و نیگر.

اسانس: اسانس شاتره ایرانی در هر دو غلظت ۰/۰۸ و ۰/۱۲ میلی‌گرم بر میلی لیتر اثر بازدارنده معنی‌دار در مقایسه با نمونه شاهد، روی رشد هر دو آسپرژیلوس داشتند (شکل ۳). این اثر در غلظت ۰/۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با اختلاف معنی‌دار بیشتر از ۰/۰۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و روی نیگر بیشتر از فلاوس بود.

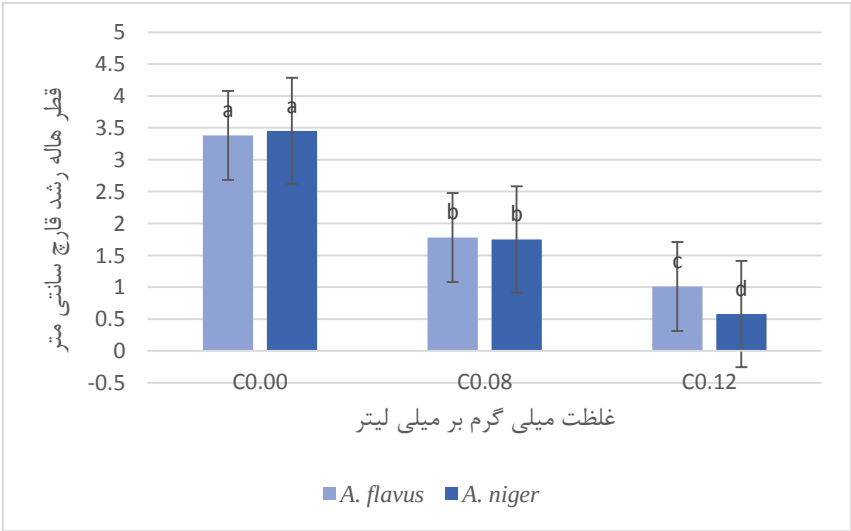
اثرات میکروسکوپی

- آسپرژیلوس فلاوس

شاهد: مطالعه ریسه‌های آسپرژیلوس فلاوس در محیط کشت بدون عصاره نشان داد که دیواره‌های سلولی منظم و صاف، ریسه‌ها دارای دیواره عرضی، بدون پلاسمولیز و وزیکوله شدن، کنیدیوفورها یک دست، کنیدیوسپورها با سطح صاف هستند. در نمونه شاهد هیچ نشانی از تکثیر جنسی و یا تشکیل آسک مشاهده نشد (شکل۴a, b).

آلکالوئید: مطالعات میکروسکوپی روی ریسه‌های فلاوس در محیط محتوی عصاره آلکالوئیدی نشان داد که اثر بازدارنده آلکالوئیدها همراه با دگردیسی ریسه‌ها است (جدول ۱). در تیمار قارچ با هر دو غلظت فراکشن ۱ آلکالوئیدی، ریسه‌ها یکپارچگی خود را از داده و در برخی نقاط ضخیم‌تر و در برخی نقاط دیگر نازک‌تر، در برخی مناطق ریسه شکسته و تاخورده، پلاسمولیز، به شدت وزیکوله (محتویات سلول‌ها به تعداد زیادی وزیکول تقسیم شده بودند)، در محل دیواره عرضی نازک و قطعه قطعه می‌شوند (شکل ۴c-e). با افزایش غلظت تا ۰/۱۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، شدت تغییرات افزایش و بسیاری از ریسه‌ها قطعه قطعه شدند. در این غلظت، تعداد نامتعارف (۴ عدد) وزیکول‌های کنیدی زا (با استریگما و کنیدیوسپور) روی یک ریسه کنیدیوفور مشاهده شد(۴f). در نمونه تیمار شده با ۰/۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر فراکشن ۱، اندام جنسی آسک با تعداد زیادی آسکسپور درون آن مشاهده شد (شکل۴e). در غلظت ۰/۰۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر فراکشن ۲ شاتره ایرانی، فیوژن و اتصال دو به دوی ۶۰% کنیدیوسپورها و در غلظت ۰/۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، قطعه قطعه شدن بیش از ۸۰% ریسه‌ها، تشکیل غیر عادی دیواره‌های عرضی و تکثیر جنسی با تشکیل آسک و آسکسپور مشاهده شد (شکل ۴g).

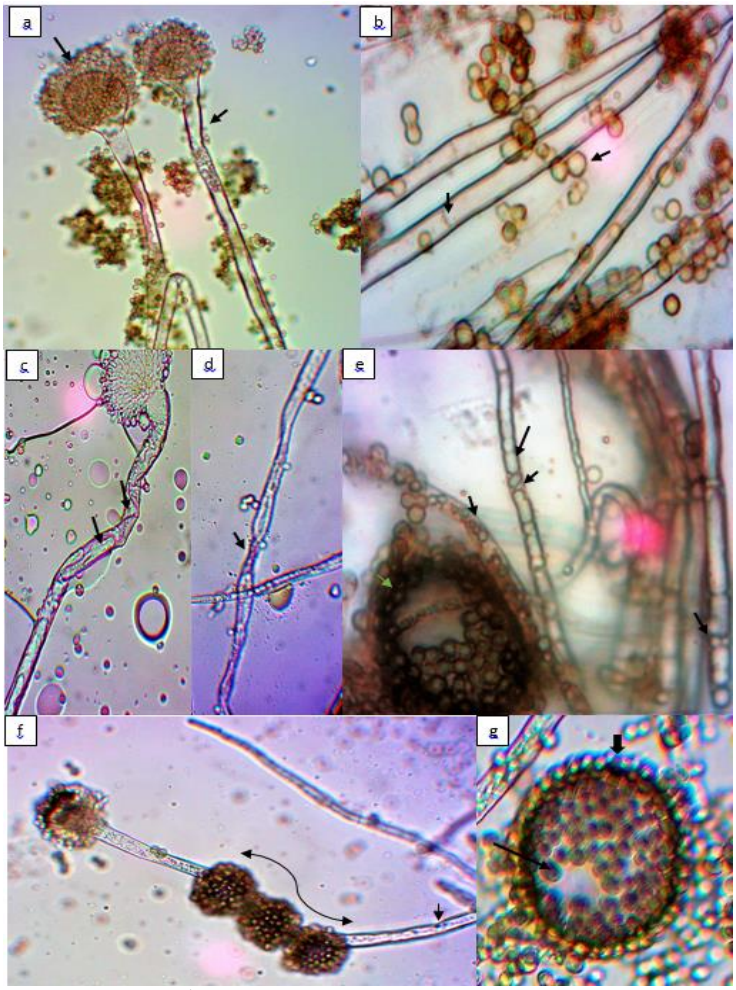
غلظت ۰/۰۸ و ۰/۱۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آلکالوئیدهای فراکشن‌های ۳ و۴ شاتره ایرانی با اثر روی دیواره و نازک شدن در برخی از نقاط ریسه و قطعه قطعه شدن ریسه‌ها، باعث کاهش رشد آسپرژیلوس فلاوس شده‌اند.



شکل ۳- مقایسه اثر غلظت‌های ۰، ۰/۰۸ و ۰/۱۲ میلی‌گرم در میلی لیتر (C) اسانس شاتره ایرانی بر رشد آسپرژیلوس فلاوس و نیگر.

جدول ۱ - اثر میکروسکوپی غلظت و فراکشن‌های آلکالوئیدی شاتره ایرانی بر ریسه، سلول و تکثیر جنسی (تشکیل آسک) آسپرژیلوس فلاوس

فراکشن (F) غلظت (C)	ریسه (%)			سلول (%)				آسک (%)
	ضخامت ریسه	شکستگی	بریدگی	ضخامت دیواره	پلاسمولیز	وزیکوله	ناهنجاری	
F0C0 (شاهد)	۱/۵	۱	۱	۱/۵	۱/۵	۰	۰	۰
F1C0.08	۱۵	۱۰	۹/۵	۲۰	۲۴	۲۶	۸	۱/۵
F1C0.12	۳۴	۱۵	۱۷	۴۵	۳۶	۲۷	۱۲	۹/۵
F2C0.08	۹	۱۰	۷	۱۵/۵	۱۱	۱۰	۷/۵	۱/۵
F2C0.12	۱۸	۱۲	۴/۵	۲۵	۲۲	۱۲	۸	۱۲
F3C0.08	۷/۵	۶	۳	۷	۸	۴	۱	۰
F3C0.12	۱۲	۶/۵	۳	۸/۵	۱۲	۸	۳	۰
F4C0.08	۸	۴/۵	۲/۵	۵/۵	۶/۵	۵	۰	۰
F4C0.12	۱۲	۵	۲	۷/۵	۱۳	۷/۵	۲/۵	۰



شکل۴- مقایسه نمونه شاهد (غلظت ۰) و اثر غلظت ۱۲ / ۰ میلی‌گرم بر میلی لیتر فراکشن‌های آلکالوئیدی شاتره ایرانی بر ساختار تکوینی و سلولی آسپرژیلوس فلاووس (بزرگنمایی ۴۰۰ برابر): **a** و **b** - ریسه، کنیدی و کنیدیوفور در محیط بدون عصاره (شاهد). **c**- شکستگی ریسه و پلاسمولیزی سلول‌های ریسه**d**- باریکی ریسه و دیواره‌های سلولی (فراکشن ۱)، **e**- تشکیل وزیکول‌های متعدد در سلول‌های ریسه، تغییر در دیواره عرضی، آسک و آسکسپورهای درون آن (فراکشن ۱)، **f**- تشکیل چند وزیکول کنیدی زا در یک امتداد روی یک کنیدیوفور(فراکشن ۱) و **g**- تشکیل آسک و آسکسپور در بافت پزدوپارانشیمی یک لایه (در فراکشن ۲).

فنل‌ها: عصاره فنلی شاتره ایرانی به شدت رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس را مهار کرد و این مهار حاصل اثر روی بخش‌های سلولی و تکوین قارچ بود (جدول ۲). غلظت ۰/۱۲ میلی گرم در میلی لیتر فنل این گیاه باعث قطعه قطعه شدن محتویات درونی سلول‌های ریسه (مشابه آپوپتوزیس)، ناهنجاری و پلاسمولیز و ضخیم شدن دیواره‌های عرضی سلول‌های ریسه‌ها و کوچک شدن سلول‌ها، تشکیل وزیکول‌ها در کنیدیفورها و عدم تشکیل استریگماتا و لقاح بین سلول‌های ریسه‌ها به طریق هم جوشی باعث مهار شدید رشد قارچ شد.

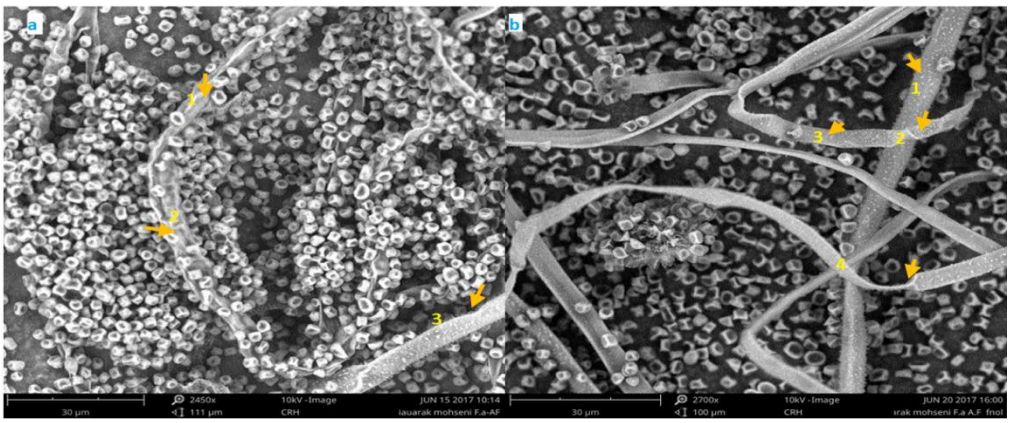
اثر غلظت ۰/۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره فنلی شاتره ایرانی بر ساختار تکوینی و سلولی آسپرژیلوس فلاووس با میکروسکوپ الکترونی نگاره نشان داد که محتویات ریسه‌ها پلاسمولیز و چروکیده و قطعه قطعه شده‌اند، ریسه در محل دیواره عرضی باریک و این باریکی در برخی نواحی در کل ریسه گسترده شده است. وزیکول و استریگماتاها تحت تاثیر این عصاره ناهنجار و تخریب شده‌اند (شکل ۵).

اسانس: اسانس (عصاره ترپنی) شاتره ایرانی به شدت رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس را مهار کرد. اسانس شاتره ایرانی، در غلظت ۰/۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، باعث باریکی و وزیکوله شدن ریسه‌ها، نازکی دیواره‌های سلولی، تشکیل اسپورهای داخلی و تخریب ریسه‌ها شدند.

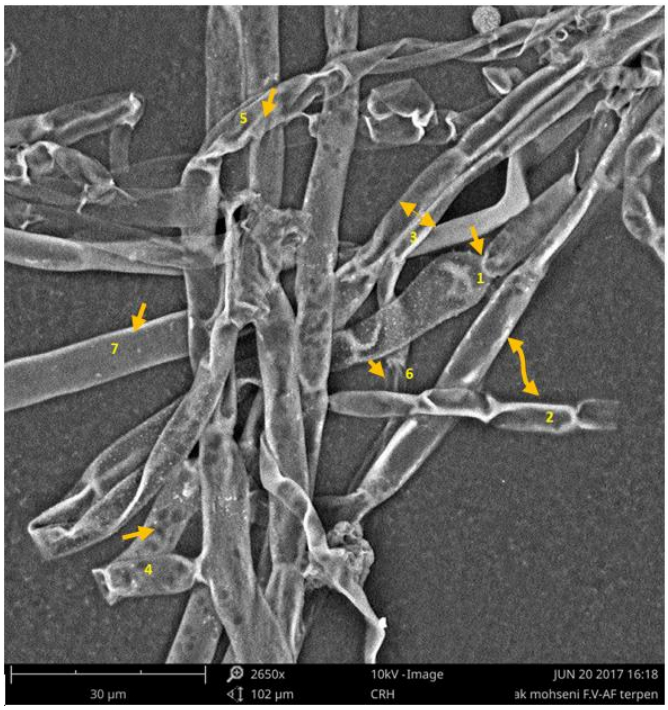
مطالعه اثر غلظت ۰/۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اسانس شاتره ایرانی بر ساختار تکوینی و سلولی آسپرژیلوس فلاووس با میکروسکوپ الکترونی نگاره نشان داد که وزیکول‌های ریسه‌ها پلاسیده و چروکیده و به صورت اجسام متراکم تیره در سلول‌ها مشاهده می‌شوند. ریسه‌ها باریک، سلول‌ها کوچک، دیواره سلول‌ها نازک و متلاشی شده‌اند. تماس و فیوژن سر به سر دو ریسه قارچ نشان دهنده تکثیر جنسی در این قارچ با القای اسانس بود (شکل ۶).

جدول۲- اثر میکروسکوپی غلظت‌های فنل و اسانس شاتره ایرانی بر ریسه، سلول و تکثیر جنسی (تشکیل آسک) آسپرژیلوس فلاوس.

عصاره و غلظت	ریسه (%)			سلول (%)			آسک (%)
	ضخامت ریسه	شکستگی	بریدگی	ضخامت دیواره	پلاسمولیز	وزیکوله	ناهنجاری	
C0 (شاهد)	۱/۵	۱	۱	۱/۵	۱/۵	۰	۰	۰
PhC0.08	۱۴	۶	۸	۸	۲۷	۲۰	۴/۵	۱
PhC0.12	۲۶	۱۲	۱۹	۱۹/۵	۳۱	۲۴	۱۲	۲/۵
EC0.08	۱۷/۵	۱۱	۸/۵	۲۱/۵	۲۸/۵	۲۳	۹/۵	۳/۵
EC0.12	۳۵	۱۹	۱۵/۵	۳۴/۵	۳۶	۳۵	۱۵	۷



شکل ۵- اثر غلظت ۰/۱۲ میلی‌گرم بر میلی لیتر عصاره فنلی شاتره ایرانی بر ساختار تکوینی و سلولی آسپرژیلوس فلاووس با میکروسکوپ الکترونی نگاره (بزرگنمایی ۲۷۰۰برابر): a- ۱: پلاسمولیز محتویات سلول‌های ریسه‌ها و ۲: چروکیده و قطعه قطعه شدن و ۳: باریک شدن ریسه. b - ۱: سطح ریسه صاف نبود و نمای کرک دار داشت، ۲: باریک شدن ریسه در جایگاه دیواره عرضی، ۳: کوچکتر شدن سلول‌های ریسه و ۴: باریکی ریسه در محل دیواره عرضی و گستردگی این باریکی در سطح یک سلول ریسه.



شکل۶- نمایش اثر غلظت ۰/۱۲ میلی‌گرم بر میلی لیتر عصاره ترپنی شاتره ایرانی بر ساختار تکوینی و سلولی آسپرژیلوس فلاووس با میکروسکوپ الکترونی نگاره: ۱- فیوژن دو ریسه، ۲- کوچک شدن سلول ها، ۳- باریک شدن ریسه‌ها، ۴- وزیکول‌های خشک شده، ۵- نازک شدن دیواره، ۶- ریسه متلاشی و ۷- ریسه عادی.

آسپرژیلوس نیگر

شاهد: مطالعه ریسه‌های آسپرژیلوس نیگر در محیط کشت بدون عصاره نشان داد که دیواره‌های سلولی منظم و صاف، ریسه‌ها دارای دیواره عرضی، بدون پلاسمولیز و بدون وزیکوله شدن، کنیدیوفورها یک دست، کنیدیوسپورها با سطح خاردار هستند. در نمونه شاهد هیچ نشانی از تکثیر جنسی و تشکیل آسک مشاهده نشد (شکل ۷a).

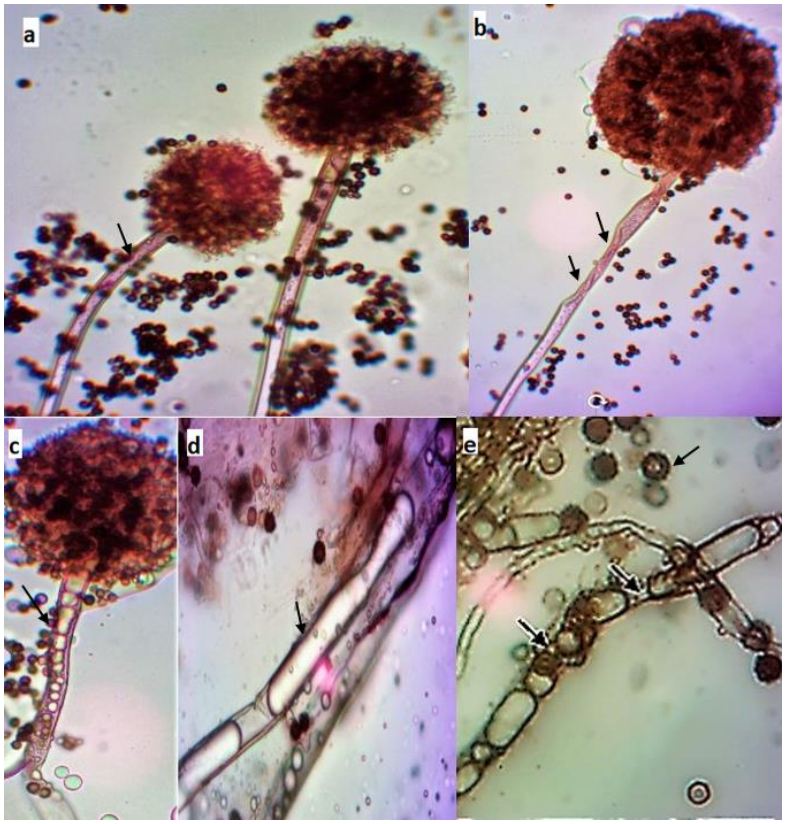
آلکالوئیدها: فراکشن ۱: هر دو غلظت (۰/۰۸ و ۰/۱۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) فراکشن ۱ آلکالوئیدی باعث کاهش چشمگیر رشد قارچ نیگر شدند (جدول ۳). مطالعات میکروسکوپی نشان داد که این اثر همراه با نازک و متلاشی شدن دیواره‌ها و پیچ خوردگی ریسه (شکل ۷b)، پلاسمولیز و قطعه قطعه شدن محتویات درونی سلول‌های ریسه (شکل ۷c و۷d)، تشکیل اسپورهای غیرجنسی با دیواره تقریبا صاف و بی‌رنگ، وزیکوله شدن، ناهنجاری و بدشکلی سلول‌های ریسه بود (شکل ۷e).

هر دو غلظت فراکشن‌های ۲، ۳ و ۴ هم اثر مهارکننده بر رشد قارچ نیگر داشتند. مطالعات میکروسکوپی نشان داد که اثر آن‌ها هم همراه با پلاسمولیز و قطعه‌قطعه شدن محتویات درونی سلول‌های ریسه، نازک و متلاشی شدن دیواره‌ها است (جدول ۳).

فنل: غلظت‌های عصاره فنلی شاتره‌ایرانی رشد آسپرژیلوس نیگر را مهار کردند و این مهار حاصل اثر روی بخش‌های سلولی و تکوینی قارچ بود(جدول ۴). هر دو غلظت فنل شاتره ایرانی باعث باریک شدن ریسه ها، تغییر در آب سلولی و القای پلاسمولیز، قطعه قطعه شدن محتویات درونی سلول‌های ریسه (مشابه آپپتوزیس)، ناهنجاری و ضخیم شدن نامنظم دیواره‌های درونی سلول و ناهنجاری وزیکول‌های کنیدیفورها و استریگماتا شدند.

اسانس: هر دو غلظت اسانس شاتره ایرانی رشد آسپرژیلوس نیگر را مهار کردند و این مهار حاصل اثر روی بخش‌های سلولی و تکوین قارچ بود (جدول ۴). اسانس هم مانند آلکالوئیدها و فنل‌های این گیاه باعث باریک شدن ریسه‌ها، تغییر در آب سلولی و القای پلاسمولیز، قطعه قطعه شدن محتویات درونی سلول‌های ریسه (مشابه آپوپتوزیس) و تشکیل آسک‌های محتوی آسکسپور شد (شکل۸).

مطالعه ریسه‌های آسپرژیلوس نیگر تیمار شده با ۰/۱۲ میلی گرم در میلی‌لیتر ترپن با میکروسکوپ الکترونی نگاره، نشان داد که ضخامت دیواره‌های سلولی ریسه در همه جا یکسان نیست و در بسیاری از بخش‌ها به شدت باریک شده است (شکل ۹).



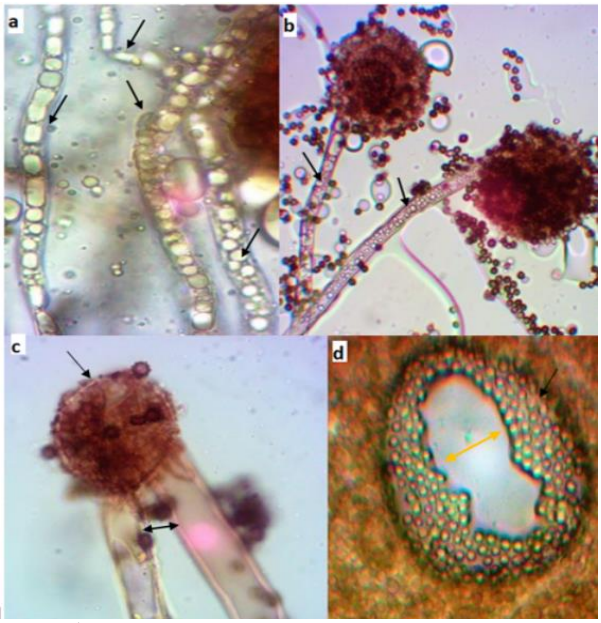
شکل۷- اثر غلظت۰ و ۰/۱۲ میلی‌گرم در میلی لیتر فراکشن ۱ آلکالوئیدی شاتره ایرانی بر ساختار تکوینی و سلولی آسپرژیلوس نیگر (بزرگنمائی ۴۰۰ برابر): a-کنیدیوفور و کنیدیوسپورها در غلظت صفر (شاهد)، b- نازک شدن دیواره‌های سلولی و شکست ریسه، c- وزیکوله شدن کنیدیوفورها، d-پلاسمولیز سلول‌های ریسه وe- وزیکوله شدن، شکستن، ناهنجاری و بد شکلی سلول‌های ریسه.

جدول۳- اثر میکروسکوپی غلظت و فراکشن‌های آلکالوئیدی شاتره ایرانی بر ریسه، سلول و تکثیر جنسی (تشکیل آسک) آسپرژیلوس نیگر

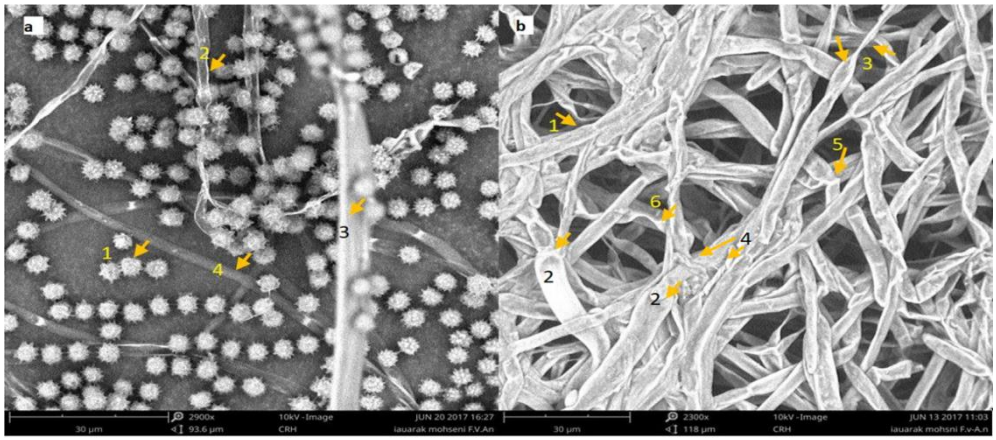
فراکشن (F)	ریسه (%)			سلول (%)				آسک (%)
غلظت (C)	ضخامت ریسه	شکستگی	بریدگی	ضخامت دیواره	پلاسمولیز	وزیکوله	ناهنجاری	
F0C0 (شاهد)	۱/۵	۱	۱	۱/۵	۱/۵	۰	۰	۰
F1C0.08	۱۶	۹	۸	۲۰	۲۴	۲۶	۸	۲/۵
F1C0.12	۳۶	۱۵	۱۸	۴۵	۳۶	۲۷	۱۲	۱۰/۵
F2C0.08	۹	۱۰	۷	۱۳/۵	۱۲	۱۰	۷/۵	۰
F2C0.12	۱۸	۱۲	۴/۵	۲۷	۲۰	۱۲	۸	۲/۵
F3C0.08	۷/۵	۶	۳	۷	۷/۵	۴/۵	۱	۰
F3C0.12	۱۲	۶/۵	۳	۸/۵	۱۲	۶	۴	۰
F4C0.08	۸	۴/۵	۳/۵	۵/۵	۶/۵	۵	۱	۰
F4C0.12	۱۴	۵	۲	۸/۵	۱۳	۷/۵	۴/۵	۰

جدول۴- اثر میکروسکوپی غلظت‌های فنل و اسانس شاتره ایرانی بر ریسه، سلول و تکثیر جنسی (تشکیل آسک) آسپرژیلوس نیگر

عصاره و غلظت	ریسه (%)			سلول (%)				آسک (%)
	ضخامت ریسه	شکستگی	بریدگی	ضخامت دیواره	پلاسمولیز	وزیکوله	ناهنجاری	
C0 (شاهد)	۱/۵	۱	۱	۱/۵	۱/۵	۰	۰	۰
PhC0.08	۱۵	۵	۹	۱۰	۲۶	۲۱	۳/۵	۱/۵
PhC0.12	۲۷	۱۳	۱۸	۲۳/۵	۳۳	۲۳	۱۰/۵	۶/۵
EC0.08	۱۷	۱۰	۸/۵	۲۰/۵	۲۸	۲۸	۸/۵	۳/۵
EC0.12	۳۸	۱۸	۱۴/۵	۳۵	۳۷	۳۳	۱۴	۷



شکل ۸- اثر غلظت ۰/۱۲ میلی گرم بر میلی لیتر اسانس شاتره ایرانی بر ساختار تکوینی و سلولی آسپرژیلوس نیگر (بزرگنمائی ۴۰۰ برابر): **a**- پلاسمولیز و قطعه قطعه شدن محتویات درونی سلول‌های ریسه و نازک و متلاشی شدن دیواره‌ها و **b**- وزیکوله و پلاسمولیز کنیدیوفورها، **c**- فیوژن راسی دو ریسه و تشکیل آسک، **d**- با کنار رفتن بخشی از پارانشیم دروغین (کاذب)، جدار آسک پدیدار شده است.



شکل۹- تصویر میکروسکوپ الکترونی نگاره اثر غلظت ۰/۱۲ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره ترپنی شاتره ایرانی بر ساختار تکوینی و سلولی آسپرژیلوس نیگر: **(a)** ۱-کنیدیوسپورهای خاردار، ۲- پارگی و خالی شدن محتویات ریسه ها، ۳- ریسه عادی و ۴- ریسه‌های باریک. **(b)** ۱- ریسه طبیعی با دیواره عرضی، فیوژن راسی بین دو ریسه، ۲- ناهنجاری در دیواره عرضی، ۳- باریکی ضخامت و برگردانی ریسه، ۴- پاره شدگی ریسه ها، ۵- شکستگی ریسه در محل دیواره عرضی و ۶- باریکی دیواره سلول ریسه.

بحث

نتایج این پژوهش نشان داد که عصاره‌های آلکالوئیدی، فنلی و اسانس شاتره ایرانی آسپرژیلوس فلاوس و نیگر اثر مهار کننده دارند. این نتیجه با گزارش اثر مهارکننده عصاره‌های خام شاتره و چند گیاه دیگر بر انواع آسپرژیلوس همخوانی دارد [۲۱] اما با گزارش بی‌اثر بودن عصاره متانولی شاتره هندی بر آسپرژیلوس فلاووس و نیگر و چهار نوع قارچ متفاوت است [۲۲]. گزارش شده که خواص دارویی گونه‌های شاتره به جهت داشتن آلکالوئید و فنل است [۲۳] و تعداد زیادی از آلکالوئیدها و فنل‌ها خاصیت ضد قارچی دارند [۱۳،۱]. در این پژوهش مشخص شد که عصاره‌های آلکالوئیدی و فنلی شاتره ایرانی اثر ضدقارچی دارند. شاتره‌ها به ویژه شاتره ایرانی غنی از ایزوکینولین آلکالوئید هستند [۴]. ایزو کینولین‌ها، گروه بزرگی از آلکالوئیدها مانند انواع پروتوبربرین و انواع دیگر آلکالوئید هستند [۵]. پروتوبربرین‌ها شامل چهار فراکشن (بخشه) ۱- آلکالوئیدهای غیربازی و ترکیبات چربی دوست، ۲- آلکالوئیدهای کوارتری بنزوفنانتریدین و پروتوپین، ۳- آلکالوئیدهای کوارترناری پروتوبربرین و ۴- ترکیبات قطبی و آلکالوئیدهای کوارترناری به شدت قطبی هستند. پروتوبربرین از ایزو کینولین‌های اصلی گیاهان تیره‌های شقایق، زرشک، شاتره و برخی تیره‌های دیگر جدا و شناسایی شده‌اند [۶،۲۳]. در این پژوهش، با جداسازی فراکشن‌های پروتوبربرینی عصاره آلکالوئیدی شاتره و اثر دادن آن‌ها روی دو گونه آسپرژیلوس مشخص گردید که فراکشن‌های پروتوبربرینی آلکالوئیدهای شاتره ایرانی اثر بازدارنده روی رشد آسپرژیلوس نیگر و فلاووس دارند. اثر مهار کنندگی فراکشن ۱ با آلکالوئیدهای غیربازی و ترکیبات چربی دوست، خیلی بیشتر از فراکشن‌های دیگر بود. اگر چه مطابق گزارش زنگ و همکاران ۲۰۲۰، گونه‌های شاتره غنی از ایزوکینولین آلکالوئیدها با فعالیت‌های دارویی و زیستی مانند حفاظت از کبد، ضد تورم، ضد تومار، ضد میکروب و ضد قارچ هستند [۲۴] و بر اساس گزارش سرما و همکاران ۱۹۹۹، بربرین یدید یک ایزوکینولین آلکالوئید است که از شاتره هندی (*F. indica*) جدا شده و اثر بازدارنده بارزی بر تندش هاگ‌های قارچ‌هایی مانند اریزیف (*Erysiphe cichoracearum*)، فوزاریوم (*Fusarium udum*) و برخی گونه‌های پنیسیلیوم (*Penicillium*) داشته است [۲۵]. ولی از آنجایی‌که گزارشی از بررسی اثر فراکشن‌های آلکالوئیدی بر قارچ‌ها و دیگر میکروارگانیسم‌ها به دست نیامد می‌توان گفت که احتمالا" این یافته‌ها برای اولین بار گزارش می‌شود.

ترکیبات فنلی: هر دو عصاره فنلی شاتره ایرانی اثر بازدارنده بر آسپرژیلوس نیگر و فلاوس داشتند. اثر بازدارندگی روی هر دو قارچ بدون مشابه بود. مطابق گزارش‌های گذشته، ترکیبات فنلی گیاهان دارای اثر ضد قارچی و دیگر فعالیت‌های زیستی هستند [۲۷،۲۵]. گزارشی از اثر عصاره فنلی شاتره ایرانی بر آسپرژیلوس‌ها به دست نیامد. ترکیبات فنلی جلبک اسپیرولینا از جلبک‌های سبز- آبی، با اثر روی غشای قارچ باعث اختلال در رشد قارچ می‌شوند که بانتایج حاصل از پژوهش ما همسو می‌باشد [۲۸]. برخی از گونه‌های شاتره غنی از ترکیبات فنلی با فعالیت آنتی اکسیدانی بالا هستند [۲۹،۹]. فنل‌ها ترکیباتی هستند که بسیاری از آن‌ها، توان ضد قارچی بالایی دارند [۴].

اسانس: برخی از اسانس‌ها مثل اسانس آویشن، رزماری و شبدر اثر ضدقارچی بسیار موثری روی آسپرژیلوس نیگر داشته‌اند [۳۰]. مشخص شده که اسانس شاتره ایرانی اثر بازدارنده بر رشد آسپرژیلوس فلاوس دارد [۳۲،۳۱]. اسانس شاتره ایرانی بر رشد هر دو قارچ آسپرژیلوس فلاوس و نیگرا اثر بازدارنده داشت. این بازدارندگی شدیدتر از عصاره‌های دیگر و بسیار شبیه اثر آلکالوئیدهای فراکشن ۱ بود. ترکیبات اسانس و فراکشن ۱ آلکالوئیدی از جهت داشتن ترکیبات چربی دوست (لیپوفیل)، مشابه هستند [۶،۲۳].

اثر ضد قارچی ترکیبات مختلف ناشی از اثر آن‌ها بر شکل، کلافی شدن، کاهش قطر و سوراخ شدگی ریسه هاست [۳۴،۳۳]. بسیاری از داروهای ضد آسپرژیلوس باعث تشکیلات غیرعادی و گلوله‌ای شدن ریسه‌ها، نازک شدن دیواره‌های سلولی و متلاشی شدن سلول‌های قارچ می‌شوند [۳۵]. اثرات ضد قارچی عصاره‌های شاتره ایرانی بر ساختار ریسه‌های آسپرژیلوس فلاوس و نیگر تقریبا مشابه بود. عصاره‌های آلکالوئیدی، فنلی و اسانس شاتره ایرانی باعث ناهنجاری در ساختار قارچ با باریک شدن، پیچ خورگی، شکستگی و متلاشی شدن ریسه شدند. این اثرات در نمونه‌های تیمار شده با فراکشن ۱ عصاره آلکالوئید و اسانس خیلی بیشتر

بود. بر اساس نتایج تروآکا و همکاران ۲۰۱۸، مواد ضد قارچ، با ممانعت از ساخته شدن یک لیپید ضروری در غشا سلولی قارچ به نام ارگواسترول (در غشای سلول‌های پستانداران وجود ندارد) از اتصال آن به دیواره قارچ جلوگیری و با ممانعت از ساخته شدن کیتین یا بتا-گلوکان در دیواره قارچ، باعث ناهنجاری، بدشکلی و تجمع سلول، جلوگیری از رشد و در نهایت باعث مرگ قارچ می‌شوند [۳۶]. ترکیبات فنلی جلبک‌ها با اثر روی ارگواسترول غشای قارچ، باعث تخریب غشا و مهار تبادل مواد می‌شود [۲۸]. گلوکوزآمین و برخی از پروتئین‌ها از عوامل محرک رشد در برخی از جنس‌های قارچ‌ها هستند [۱۶]. برخی از ترکیبات فنلی مثل تانن‌ها وقتی با پروتئین‌های قارچ‌ها ترکیب می‌شوند، اثر سمی خود را روی سلول‌های قارچ نشان می‌دهند. برخی دیگر از ترکیبات فنلی مثل فنلیک اسیدها، فلاونوئیدها، کاتشین‌ها، چالکون‌ها، گزانتون‌ها، استیلبن‌ها، آنتوسیانین‌ها، آنتروکوائینین‌ها و نفتوکوائینین‌ها طبیعت چربی دوستی (لیپوفیل) دارند که با این ویژگی روی ترکیبات غشا اثر گذاشته و تبادل مواد از آن مهار می‌کنند [۱۷].

مطالعه میکروسکوپی اثر عصاره آلکالوئیدی، فنل و اسانس شاتره ایرانی روی آسپرژیلوس فلاوس و نیگر نشان داد که این عصاره‌ها با القای پلاسمولیز روی غشاهای سلولی اثر دارند. این عصاره‌ها باعث نازک شدن و شکستگی دیواره در برخی از ریسه‌ها، صدمه زدن به غشای سلولی، القای پلاسمولیز و از هم پاشیدگی ساختار سلولی ریسه‌ها و جلوگیری از رشد دو گونه آسپرژیلوس شدند. این یافته‌ها با داده‌های برول و کلیس ۱۹۹۹، که گزارش کرده‌اند فنل‌ها به جهت ساختار مولکولی خاص و امکان نفوذ به درون سلول قارچ فعالیت ضد قارچی بالایی در برابر قارچ‌های بیماریزا دارند. این ترکیبات با مواد سلولی قارچ مثل ارگوسترول، گلوکان، کیتین، پروتئین‌ها و گلوکزآمین برهمکنش داشته و باعث از کار افتادن این ترکیبات در قارچ می‌شوند، همخوانی دارد [۱۵]. برخی از فعالیت‌های زیستی شاتره‌ها به دلیل داشتن ایزوکواینولین آلکالوئیدهای چربی دوست است [۷]. ترکیبات لیپوفیل روی غشای پلاسمایی سلول‌های قارچ اثر گذاشته، نفوذپذیری غشا را تغییر داده و از مبادله ماکرو مولکول‌ها جلوگیری می‌کنند [۳۵]. اسانس‌ها، ترکیبات فراکشن ۱ آلکالوئیدها و برخی از ترکیبات فنلی طبیعت چربی دوستی داشته و روی ترکیبات غشا اثر گذاشته تبادل مواد از خلال آن را مختل می‌کنند [۱۷]. قبلا تصور می‌شد، بیشتر گونه‌های آسپرژیلوس از جمله فلاوس و نیگر فاقد تولید مثل جنسی هستند. تحقیقات النا و همکاران ۲۰۲۰، نشان داده این قارچ‌ها به ویژه گونه‌های بیماریزا مانند فلاوس دارای ژن‌های جنسی بوده و در شرایط اکولوژیکی خاص می‌توانند به طریق جنسی تکثیر شوند [۳۷]. فراکشن‌های ۱ و ۲ آلکالوئیدها، فنل‌ها و اسانس، اندام آسکوگونیم محتوی آسک با تعداد زیادی آسکسپور مشاهده شد. تشکیل این اندام‌جنسی در نمونه‌های تیمار شده با فراکشن ۱ آلکالوئیدی و ترپن‌ها بیشتر بود. یافته‌های این پژوهش همسو با یافته‌های میلگروم ۱۹۹۶، می‌باشد که گزارش کرده بسیاری از قارچ‌های بیماریزا که به عنوان قارچ‌های بدون تکثیر جنسی شناخته می‌شوند وقتی در پایان فصل رشد در کمبود مواد غذایی و یا تنش‌های دیگر قرار می‌گیرند، به طریق جنسی تکثیر می‌یابند [۳۸]. علاوه بر آن با گزارش هورن و همکاران ۲۰۰۹، که بیان می‌کند در حضور برخی از مواد تنش‌زا و در شرایط محیطی خاص در برخی از گونه‌های بیماریزای آسپرژیلوس، تکثیر جنسی با تشکیل آسک و آسکسپور در پارانشیم دروغین استروما مشاهده می‌شود [۳۹] همخوانی دارد. به طور مثال مطابق گزارش تاوانتی و همکاران ۲۰۰۴، گونه‌های کاندیدا (*Candida*) به عنوان قارچ‌های بدون تکثیر جنسی شناخته می‌شوند ولی مدارکی وجود دارد که نشان می‌دهد تکثیر جنسی در آن‌ها وجود دارد که باعث نوترکیبی در بسیاری از آن‌ها می‌شود [۴۰].

به طورکلی می‌توان نتیجه گرفت که شاتره ایرانی یک گیاه کوچک سرشار از ترکیبات فنلی و آلکالوئیدی با فعالیت زیستی است. مطابق گزارش زنگ و همکاران ۲۰۲۰، که بیان کرده‌اند، گونه‌های شاتره غنی از ایزوکینولین آلکالوئیدها با فعالیت‌های دارویی و زیستی مانند حفاظت از کبد، ضد تورم، ضد تومار، ضد میکروب و ضد قارچ هستند [۲۴]، شاتره ایرانی دارای چهار گروه آلکالوئید از ایزوکینولین‌ها با خاصیت ضد قارچی است که می‌توان آن‌ها را با استفاده از حلال‌های مختلف جدا کرد. فنل‌ها، آلکالوئیدها و اسانس این گیاه خاصیت ضد آسپرژیلوس خوبی داشتند. این عصاره‌ها با اثر روی دیواره‌ها و

غشاهای سلولی ریسه‌های آسپرژیلوس و مختل کردن عملکرد زیستی سلول، اثر بازدارنده خود را نشان دادند. بر اساس گزارش سرما و همکاران ۱۹۹۹، بربرین یدید یک ایزوکینولین آلکالوئید است که از شاتره هندی (*F. indica*) جدا شده و اثر بازدارنده بارزی بر تندش هاگ‌های قارچ‌هایی مانند اریزیف (*Erysiphe cichoracearum*)، فوزاریوم (*Fusarium udum*) و برخی گونه‌های پنیسیلیوم (*Penicillium*) داشته است [۲۵].

نکته جالب در اثر بازدارندگی این بود که همه عصاره‌ها اثر میکروسکوپی مشابه با کمی تفاوت داشتند و برخی از آن‌ها باعث القای تکثیر جنسی که در شرایط تنش در قارچ رخ می‌دهد، شدند. این نتیجه با گزارش دایر و پائولتی ۲۰۰۵،که بیان کرده‌اند سال‌های زیادی است گونه‌های آسپرژیلوس به عنوان قارچ‌های فاقد تکثیر جنسی، شناخته می‌شوند ولی توالی سنجی ژنتیکی نشان داده که آسپرژیلوس فومیگاتوس (*A. fumigatus*) دارای ژن‌های تکثیر جنسی بوده و در شرایط خاص قادر به این نوع تکثیر است [۴۱].

تقدیر و تشکر: از جناب آقای مهندس مهدی سلیمی کارشناس محترم آزمایشگاه‌های تحقیقاتی دانشگاه آزاد ساوه و سرکار خانم سمانه شعبانی که در انجام این تحقیق کمک مؤثر داشتند، صمیمانه تشکر می‌کنیم.

منابع

[1] Liden M. Notes on Dionysia, *Cordalis* and *Fumaria* in Iran. Iranian Journal of botany 2008 ;(2): 303-308.

[2] Pandy V.B., Ray A.B., Dasgupta B.. Quaternary alkaloids of *Fumaria indica*, phytochem. 1976; 15 (4): 545- 546.

[3] Modi K., Amin A., Shah M. A pharmacognostical study on *Fumaria parviflora* Lamk. Natural Remedies 2016; 16: 1–6.

[4] Erdogan T.F. Brine shrimp lethality bioassay of *Fumaria densiflora* Dc. and *Fumaria officinalis* L. Extracts. Hacettepe University J of Pharmacy. 2009;28(2):125-132.

[5] Sousek J., Guedon D., Adam T., Bochorakova H., Taborska E., Valka I., Simanek V. Alkaloids and organic acids content of eight *Fumaria* species. Phytochem. Analys. 1999;10(1): 6-11.

[6] Pfoze N.L., Myrboh B., Kumar Y., Rohman, M.D.R.. Isolation of protoberberine alkaloids from stem bark of *Mahoniam anipurensis*.Takeda Using RP-HPLC, 2014;2(2): 48-57.

[7] Chelbek J., Novak Z., Kassemova D., Safratova M., Kostelnik J., and Maly, L. Isoquinoline alkaloids from *Fumaria officinalis* L. and their biological activities related to alzheimer's disease. Chem. Biodivers. 2016;13(1):91-99.

[8] Jediyi H., Naamani K., Elkoch A.A., Dihazi A., Lmjiber N. A comparative study of phenols composition, antioxidant and antifungal activity of *Vitis vinifera*. Food safety. 2020;40(2): 1275-1283.

[9] Jaberian H., Piri K., Nazari JPhytochemical composition and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of some medicinal plants. Food Chem. 2013; 136 (1): 237-244.

[10] Josaquin- Ramas A.J., Lopeez- Palestina C.U., Pinedo-Espinoza J.M., Altamirano-Romo S.E., Santago- Sanez Y.O., Aguire-Mancilla C.L., Guterrez- Tlahque J.. Phenolic compounds, antioxidant properties and antifungal activity jarilla (*Barkleyanthus salicifolius*). Chil J Agric Res. 2020;80(3): 1-8.

[11] Loukas T. Citric and gluconic acid production from fig by *Aspergillus niger* using solid-state fermentation. J indian microb Biotechnol. 2000;25: 298–304.

[12] Krijgsheld P., Bleichrodt R., Van Veluw G.j., Wang F., Muller W.H. Development in *Aspergillus*. Stud. Mycol. 2012;74: 1-29.

[13] Bentley K.W. B-phenilethylamine and Isoquinoline. Nat. prod. Rep. 2006;22: 249-268.

[14] Atta-Ur-Rahman A., Nasreen A., Akhtar F., Shekhani M.S., Clardy J., Parvez M., Chaudhary M.I. Antifungal diterpenoid alkaloids from *Delphinium denudatum*. J.Nat.Prod. 1997;60, 472-474.

[15] Brul S., Klis F.M. Mechanistic and Mathematical inactivation studies of food spoilage fungi. Fungal genetics and biology, Orlando. 1999;27:199-208.

[16] Sparringa R.A., Owens J.D. Glucosamine content of tempemould, Rhizopus oligosporus. Int. J. Food Microb. 1999;47:153-157.

[17] Meschini S., Marra M., Calcabrini A., Federici E., Galeffi C., Arancia Voacamine G. A bisindolic alkaloid from Peschiera fuchsiaefolia, enhances the cytotoxic effect of doxorubicin on multidrug- resistant tumor cells. Int. J. Oncol. 2003;23: 1505– 1513.

[18] Dixon RAPlant cell and tissue culture. Oxford, UK. 1987; IRI Press.

[19] Marek, R., Seckarova P., Hulova D., Marek J., Dostal J., Sklenar V. Palmatine and berberine isolation artifacts. J. Nat. Prod. 2003;66: 481–486.

[20] Bamoniri A., Behpour M., Khayat Kashani M. Quantification of total phenolics and tannins of pomegranate extraction. J. Optoel. Biomed. Mate. 2010;2(1): 25– 31.

[21] Sales M.D.C., Costa H.B. Antifungal activity of plant extracts with potential to control of plant pathogens in pineapple. Asian Pac. J. Trop. Biomed. 2016;6 (1): 26-31.

[22] Khan I., Ahmad H., Ali N., Ahmad B., Azam S., Hassan F. Screening of *Fumaria indica* for antibacterial and antifungal activities. Int. J.Curr. Biotech. 2013;1(9): 13- 16.

[23] Sener B. Turkish species of *Fumaria* and their alkaloid. Pharmaceutical Biol. 2008;24(2), 105-106.

[24] Zhang R., Guo Q., Kennely E.J., Long C., Chai X. Diverse alkaloids and biological activities of *Fumaria* (Papaveraceae): An ethnomedicinal group. Fitoterapia 2020;146: 104697.

[25] Sarma B.K., Pandey V.B., Mishra G.D., Singh U.P. Antifungal activity berberine iodid, a constituent of *Fumaria indica*. Folia Microbiologica 1999;44: 164-166.

[26] Riaz T., Abbasi M., Rehman A., Shahzadi T.S., Ajaib M. *Fumaria indica*: A valuable natural source of antioxidants for protection against oxidative stress. J Pharmacol Sci In Novo. 2012;1: 16–21.

[27] Najeeb-Ur-Rehman B.S., Al-Rehaily A.J., Gilani A.H. Mechanisms underlying the antidiarrheal, antisoasmodic and bronchodilatator activites of Fumaria parviflora and involvement of tissue and species specificity. J. Ethnopharmyco. 2012;144: 128–137.

[28] Peeler T.C. Lipid Chracterization of an enriched plasma membrane fraction of *Dunaliell asalina* Grown in media of varying salinity. Plant Physiol. 1989;89: 970-976.

[29] Ivan G.I., Radka Z.V., Andrey S.M., Nadezhda T.P., Ina Y.A., Panteley P.D. Antioxidant activities and phenolic compounds in Bulgarian *Fumaria* species. Int. J.Curr.Microb. Apply Sci. 2014;3(2): 296-306.

[30] Latifa B., Bouchra L., Sanaa A., Najat C., Fouzia C., Adnane R. Comparative study of the antifungal activity of some essential oils and their major phenolic components against *Aspergillus niger* using three different methods. African Journal of Biotechnology. 2012;11: 14083-87.

[31] Mazu T.K., Bricher B.A., Flores- Rozas H., Ablordeppey S.Y. The mechanistic targets of antifungal agents. Medical Chemistry. 2016;16: 555-578.

[32] Moghtader M*In vitro* antifungal effects of *Fumaria vaillantii* essential oil on *Aspergillus flavus*. J Yeast Funga. Res. 2013; 4(2): 21-25.

[33] Segvic K.M., Kosalec I., Mastelic J., Pieckova E., Pepeljnak S. Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) Essential oil and thymol against moulds from damp dwellings. Letter Apply Microb. 2007;44 (1):36-42.

[34] Nampaque M.A., Oviedo L.A., Gil J.H., Garcia C.M., Durango D.L. Thymol and carvacrol: biotransformation and antifungal activity against the plant pathogenic fungi *Colletotrichum acutatum* and *Botryodiplodia theobromae*. Trop. Plant Patho. 2011;36: 3-13.

[35] Safdar N, Yaqeen N, Kazemi Z, Yasmine AAntimicrobial potential of *Mazus japonicus* and *Fumaria indica* extracts. J. Her. Spic. Medici. Plant. . 2017; 23 (4): 272-283.

[36] Truecka K., Chylewska A., Kawiak A., Waleron K.F. Antifungal activity and mechanism of action of the Co (III) coordination complexes with diamine chelate ligands against reference and clinical strains of *Candida spp.* Front. Microbiol. 2018;9(1594): 1-14.

[37] Ellena V. Sauar M., Steiger M. The fungal revolution continues. Fungal Biology and Biothecnology. 2020;7(17): 1-7.

[38] Milgrom M.G. Recombination and multilocus structure of fungal population. Ann. Rev. Phytopath. 1996;34: 457- 477.

[39] Horn B.W., Moore G.G., Carbon I. Sexual reproduction in *Aspergillus flavus*. Mycologia. 2009;101(3):423-429.

[40] Tavanti A., Gaw N.A.R., Maiden M.C.J., Oddes F.C., Shaw D.J. Genetic evidence for recombination in *Candida albicans* based on haplotype analyis. Fungal. Genet. Biol. 2004;41:553-562.

[41] Dyer P.S., Paoletty M. Reproduction in *Aspergillus fumigatus*: Sexuality in a supposedly asexual species? Medical Mycology 2005;43 (1): S7-S14.

Macroscopic and microscopic study of antifungal effects of alkaloids, phenol and essential oil of *Fumaria vaillantii* on *Aspergillus flavus* and *A. niger*

Mohseni M.[1], Ataei Azimi A.[2*], Delnavaz Hashemloian B.[2], Farzami Sepehr M.[2]

[1] Ph.D. student, Department of Biology, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran.
[2] Associate professor, Department of Biology, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran.

* (Corresponding author): baharana1395@gmail.com

Received: July 2021 Accepted: September.2021

Abstract

Fumaria vaillantii belongs to the Fumariaceae family, is a plant rich in secondary compounds with medicinal effects. Alkaloids, phenols and essential oil were extracted to measure antifungal activity. Crude extract with ethanol was obtained from plant shoots. Crude extract was used to separate the alkaloid and phenol fractions. Alkaloids were extracted in four fractions. The essential oil was extracted with a Clevenger apparatus. *Aspergillus flavus* and *A. niger* were prepared from Pasture Institute in Iran. *Aspergillus* specimens (disc diameter 5 mm) were cultured in the potato dextrose agar media with different amounts of phenolic, alkaloid and essential oil extracts. *Aspergillus* hyphae were studied under control and after treatment with phenolic, alkaloid and essential oil extracts by light microscopy and scanning electron microscopy (SEM). The anti- *Aspergillus* effects of the phenolic, alkaloid and essential oil extracts of *F. vaillantii* against *A. flavus*, and *A. niger* were severe. Two concentrations of all three extracts inhibited fungal growth. The results of light microscopy and scanning electron microscopy showed that the *F. vaillantii* extracts affected on the fungus cell structure. They cause thinning and breaking of walls, plasmolysis and vesiculation of cells of some filaments, inhibiting the growth and induction of fungal death. Phenolic, alkaloid extracts and essential oils of *F. vaillantii* had similar antifungal activity on both species of *Aspergillus*. *F. vaillantii*, is a plant rich in phenolic compounds, alkaloids and essential oils with antifungal effects.

Keywords: Alkaloid, Antifungal, *Aspergillus*, *Fumaria*, Phenol.