کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
دورهٔ ۷، شمارهٔ ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۷ (۶۴-۵۸)
DOI: 10.22059/jbioc.2018.258428.232

اثر عصاره‌های شیرین‌بیان، دارچین و ریحان بر کنترل *Fusarium graminearum* و بیان ژن‌های ضروری دخیل در تولید زیرالنون

حمیدرضا گنجعلی[۱]، جواد آبخو[۲]* و ابراهیم دهمرده[۳]
۱. استادیار گروه کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زاهدان، ایران ۲. مربی پژوهشکده کشاورزی دانشگاه زابل، زابل، ایران
۳. کارشناس پژوهشکده کشاورزی دانشگاه زابل، زابل، ایران
(تاریخ دریافت: ۹۷/۰۳/۰۱- تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۴/۳۱)

چکیده

قارچ ***Fusarium graminearum*** عامل بیماری بلایت فوزاریومی سنبله است، این بیماری یکی از بیمارهای مهم غلات است و این قارچ باعث خسارت کمی و کیفی زیادی به گندم می شود. کاهش عملکرد محصول گندم به علت کاهش تعداد دانه‌ها و چروکیده شدن دانه‌ها است و کاهش کیفیت دانه به دلیل تجمع مایکوتوکسین‌ها (زهرابه‌های قارچی) در آنهاست. در این تحقیق اثر عصاره‌های شیرین‌بیان، دارچین و ریحان بر کنترل رشد ***F. graminearum*** و بیان ژن‌های اصلی دخیل در زیست‌ساخت زیرالنون بررسی شد. پس از کشت ***F. graminearum*** در محیط **P D B**، حداقل غلظت بازدارندگی (**MIC**) رشد قارچ تحت اثر عصاره‌ها با استفاده از روش میکروتیتر پلیت اندازه‌گیری شد. همچنین بیان ژن‌های ***PKS4***، ***PKS13***، ***FG12056*** و ***FG02398*** با تکنیک **Real-time PCR** ارزیابی شد. عصاره شیرین‌بیان کمترین مقدار **MIC** (۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر) و عصاره‌های دارچین و ریحان بیشترین مقدار **MIC** (۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر) را داشتند. عصاره شیرین‌بیان با کمترین مقدار حداقل غلظت قارچ‌کشی (**MFC**) (۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر)، بالاترین خاصیت قارچ‌کشی روی ***F. graminearum*** را داشت و عصاره‌های دارچین و ریحان بیشترین مقدار **MFC** (۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر) را داشتند. میزان بیان ژن‌های ***PKS4***، ***PKS13***، ***FG12056*** و ***FG02398*** به طور معنی داری توسط عصاره شیرین‌بیان کاهش یافت. نتایج این تحقیق نشان داد که عصاره شیرین‌بیان دارای خاصیت قارچ‌کشی و کنترل‌کنندگی بر رشد قارچ ***F. graminearum*** است و میزان بیان ژن‌های اصلی در مسیر زیست‌ساخت زیرالنون را کاهش می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: دارچین، ریحان، شیرین‌بیان، فعالیت ضدقارچی، ***Fusarium graminearum***.

Effect of extracts of *Glycyrrhiza glabra*, *Cinnamomum zeylanicum* and *Ocimum basilicum* on *Fusarium graminearum* control and expression of essential genes in zearalenone biosynthetic pathway

Hamidreza Ganjali [1], Javad Abkhoo [2*] and Ebrahim Dehmardeh [3]
1. Assistant Professor, Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Zahedan Branch, Islamic Azad University, Zahedan, Iran 2. Instructor, Agricultural Research Institute, University of Zabol, Zabol, Iran
3. Expert, Agricultural Research Institute, University of Zabol, Zabol, Iran
(Received: May 22, 2018- Accepted: July 22, 2018)

ABSTRACT

Fusarium graminearum causes Fusarium head blight, an important disease of cereals that leads to extensive yield and quality loss of wheat. Yield losses results from reduction in the number of kernels and shriveled kernels and grain quality is reduced due to accumulation of mycotoxins. In this study, the effects of ethanolic extracts of *Glycyrrhiza glabra*, *Cinnamomum zeylanicum* and *Ocimum basilicum* on *F. graminearum* growth and the expression of some essential genes in zearalenone biosynthetic pathway were investigated. Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) were measured. The expression of *PKS4*, *PKS13*, *FG12056*, and *FG02398* genes were evaluated using a quantitative real-time PCR (qRT-PCR) technique. *Glycyrrhiza glabra* extract had the the lowest MIC value (25 mg/ml) and the extracts of *C. zeylanicum* and *O. basilicum* had the highest MIC value (50 mg/ml). *Glycyrrhiza glabra* extract had the lowest MFC value (50 mg/ml) and the highest fungal property on *F. graminearum*, and the extracts of *C. zeylanicum* and *O. basilicum* had the highest MFC value (100 mg/ml). The expression of *PKS4*, *PKS13*, *FG12056*, and *FG02398* genes were significantly decreased by *G. glabra* extract. The results of this study showed that the *G. glabra* extract has fungicidal and inhibitory effects on *F. graminearum* and reduces the expression of essential genes in zearalenone biosynthetic pathway.

Keywords: antifungal activity, *Cinnamomum zeylanicum*, *Fusarium graminearum*, *Glycyrrhiza glabra*, *Ocimum basilicum*.

* Corresponding author E-mail: javad.abkhoo@yahoo.com

تازه‌های تحقیق

عصاره شیرین بیان کمترین مقدار MIC (۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر) و عصاره‌های دارچین و ریحان بیشترین مقدارMIC (پنجاه میلی‌گرم بر میلی لیتر) را داشتند. عصاره شیرین بیان کمترین مقدار حداقل غلظت قارچ-کشی (MFC) (پنجاه میلی‌گرم بر میلی لیتر) و بالاترین خاصیت قارچ‌کشی روی *F. graminearum* را داشت و عصاره های دارچین و ریحان بیشترین مقدار MFC (یکصد میلی‌گرم بر میلی لیتر) را داشتند. بیان ژن‌های PKS4, PKS13, FG12056, FG02398 به‌طور معنی-داری توسط عصاره شیرین بیان کاهش یافت. نتایج این تحقیق نشان داد که عصاره شیرین بیان دارای خاصیت قارچ‌کشی و مهارکنندگی بر رشد قارچ *F. graminearum* است و بیان ژن‌های اصلی در مسیر بیوسنتز زیرالنون را کاهش می‌دهد.

مقدمه

قارچ *Fusarium graminearum* عامل بیماری بلایت فوزاریومی سنبله است که این بیماری یکی از بیماری-های مهم غلات است (Gagkaeva and Yli-Mattila 2004). قارچ *F. graminearum* عملکرد و کیفیت دانه گندم را به‌طور قابل توجهی کاهش می‌دهد (Bai and Shaner 1994). کاهش عملکرد ناشی از کاهش تعداد دانه‌ها و چروکیده شدن دانه‌ها است و کاهش کیفیت دانه به‌دلیل تجمع مایکوتوکسین‌ها (زهرابه‌های قارچی) در آنهاست (McMullen *et al*. 1997). زهرابه‌های زیرالنون (Zearalenone) و دِاُکسی نیوالنول (Deoxynivalenol) توکسین‌های مهمی هستند که به وسیله قارچ*F. graminearum* تولید می‌شوند (Bottalico and Perrone 2002). زیرالنون سبب سندروم هیپرستروژنیک (hyperestrogenic syndrome) در انسان و ناباروری در حیوانات و دام‌ها می‌گردد (Zinedine *et al*. 2007). چهار ژن *PKS4*، *PKS13*، *FG12056* و *FG02398* نقش اصلی در تولید توکسین زیرالنون دارد (Gaffoor and Trail 2006, Kim *et al*. 2005, Lysoe *et al*. 2006). عصاره‌ها و ترکیبات مشتق شده از گیاهان دارویی عوارض جانبی نامطلوب در انسان و محیط زیست ندارند، به‌همین دلیل استفاده از آنها برای کنترل میکروارگانیزم‌های بیماری‌زا در حال افزایش است. از جمله گیاهان دارویی، که آثار ضدمیکروبی آن‌ها به اثبات رسیده شامل شیرین‌بیان، دارچین و ریحان هستند. گیاه شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra*) دارای خصوصیات ضدقارچی و باکتریایی است (Abkhoo and Jahani 2017, Nitalikar *et al*. 2010). از آن‌جایی که عصاره شیرین-بیان دارای خواص ضدقارچی و ضدباکتریایی است می-تواند رشد قارچ *F. oxysporum* و باکتری‌های *Bacillus subtilis*، *Staphylococcus aureus*، *Escherichia coli* و*Pseudomonas aeruginosa* را کنترل کند. بررسی‌ها نشان داده که اسانس دارچین (*Cinnamomum zeylanicum*) دارای خواص قارچ‌کشی و قارچ‌ایستایی بر علیه قارچ‌های *F. proliferatum* و *Colletotrichum musae* است و می‌تواند به عنوان عوامل ضدقارچی برای مدیریت بیماری‌های قارچی پس از برداشت موز استفاده شود (Ranasingh *et al*. 2002). اسانس ریحان (*Ocimum basilicum*) بطور کامل رشد پرگنه-ای ۲۲ گونه قارچ را کنترل کرد و در برابر *F. moniliforme* و *C. musae* از قارچ‌کش‌هایی مانند آگرازیم (Agrazim) و باویستین (Bavistin) موثرتر می‌باشد (Dube *et al*. 1989). بنابراین هدف از این تحقیق بررسی تاثیر عصاره‌های شیرین‌بیان، دارچین و ریحان بر رشد*F. graminearum* و بیان ژن‌های اصلی دخیل در زیست‌ساخت زیرالنون بود.

مواد و روش

تهیه عصاره‌های گیاهی

در این بررسی گیاهان شیرین‌بیان، دارچین و ریحان تهیه و پس از شستشو، نمونه‌ها در دمای اتاق و دور از نور مستقیم خورشید در سایه خشک گردیدند. پس از خشک کردن ریشه‌ها و برگ‌ها در سایه، ریشه‌های شیرین‌بیان، برگ‌های ریحان و پوست دارچین توسط دستگاه آسیاب تا قطر حداکثر دو میلی‌متر پودر گردید. جهت تهیه عصاره‌ها، سیصد میلی‌لیتر حلال اتانول به سی گرم از پودر خشک شده اضافه شد و ترکیب حاصله به مدت ۲۴ساعت با سرعت یکصد دور در دقیقه تکان داده شد (Jahani *et al*. 2016).

عصاره‌ها توسط کاغذ صافی واتمن صاف شده و سپس توسط دستگاه روتاری تغلیظ شد. برای خشک شدن کامل، عصاره‌ها به آون با دمای چهل درجه سلسیوس منتقل شدند. عصاره‌ها تا زمان استفاده در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری گردیدند.

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت قارچ‌کشی (MFC)

برای تعیین MIC عصاره‌های گیاهی از روش میکروتیتر پلیت استفاده شد (Eloff 1998). عصاره‌های خام گیاهی به صورت سریال از ۲۰۰ تا ۶.۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر رقیق شدند. در هر چاهک یکصد میکرولیتر از هر رقت عصاره با یکصد میکرولیتر محیط Potato Dextrose Broth (PDB) مخلوط شد. سوسپانسیون اسپور قارچ با استفاده از روش فلاح پور و همکاران تهیه شد (Fallahpour *et al*. 2010) و تعداد ماکروکنیدی در میلی‌لیتر با استفاده از لام هموسایتومتر شمارش و غلظت نهایی اسپور روی ۲×۱۰^{۶} ماکروکنیدی در میلی-لیتر تنظیم شد (Abril *et al*. 2008). در شرایط استریل به هر چاهک حاوی رقت‌های مختلف عصاره ده میکرولیتر از سوسپانسیون قارچی افزوده شد. همچنین دو چاهک نیز با افزودن یکصد میکرولیتر محیط کشت PDB که یکی حاوی ده میکرولیتر اسپور قارچی و دیگری فاقد اسپور قارچی بود به عنوان کنترل‌های مثبت و منفی در نظر گرفته شد. پس از انکوباسیون ۴۸ساعته در دمای ۲۸ درجه سلسیوس 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 کنترل‌کنندگی عصاره در رقت مورد نظر بود. برای تعیین MFC عصاره‌های گیاهی از روش اسپینل-اینگراف و همکارن استفاده شد (Espinel-Ingroff *et al*. 2002). پس از انکوباسیون ۷۲ ساعته در دمای ۲۸ درجه سلسیوس بیست میکرولیتر از چاهک‌های فاقد رشد قارچ و کنترل مثبت روی محیط PDA کشت داده شد. کمترین رقت موجود از عصاره که رشد قارچ مشاهده نگردید به‌عنوان MFC هر عصاره در نظر گرفته شد.

بررسی اثر عصاره شیرین‌بیان بر بیان ژن‌های دخیل در زیست‌ساخت زیرالنون

قارچ *F. graminearum* IRAN 124C در محیط Potato Dextrose Broth (PDB) در حضور عصاره شیرین‌بیان با غلظت $mg\ mL^{-1}$ ۲۵ کشت داده شده و به‌مدت سه روز در انکوباتور ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شد. استخراج RNA از قارچ توسط کیت شرکت TOPAZ GENE RESEARCH انجام شد. جهت سنتز رشته اول cDNA از کیت (First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas) استفاده شد. جهت بررسی میزان بیان ژن‌های مورد نظر (جدول ۳) از تکنیک Real Time PCR استفاده شد. ارزیابی کمی میزان بیان ژن با استفاده از روش مقایسه چرخه آستانه (Cycle threshold) انجام شد. تغییرات نسبی بیان ژن‌های هدف نسبت به ژن خانه‌دار *EF1a* نرمال می‌شود (Kim and Yun 2011). محاسبه و تغییرات بیان ژن به‌وسیله نرم‌افزار REST اندازه‌گیری می‌شود (Pfaffl *et al*. 2002).

جدول۱- مشخصات آغازگرهای ژن‌های استفاده شده در این تحقیق

Table 1. Nucleotide sequences of primers used in this study

Gene	Forward primer 5-3	Reverse primer 5-3	Reference
PKS13	CCCAACTCGACGTCAAATCTAT	CTTCCCGCCGACTTCAAAACA	(Lysøe *et al*. 2006)
PKS4	GCTTCGCTAGACCGTGAGTT	ATGCCCTGATGAAGAGTTTGAT	(Lysøe *et al*. 2006)
FG12056	CATTTGGTACACGAGCGACTA	TCTCGCACTTGTTCACACGAT	(Lysøe *et al*. 2009)
FG02398	GCGGGATTAACCGCTGTGG	GCATGCCCGAAACCGAAAGT	(Lysøe *et al*. 2009)
EF1a	TCACCGACTACCCTCCTCT	TCGACGGCCTTGATGACAC	(Kim and Yun 2011)

تجزیه و تحلیل آماری

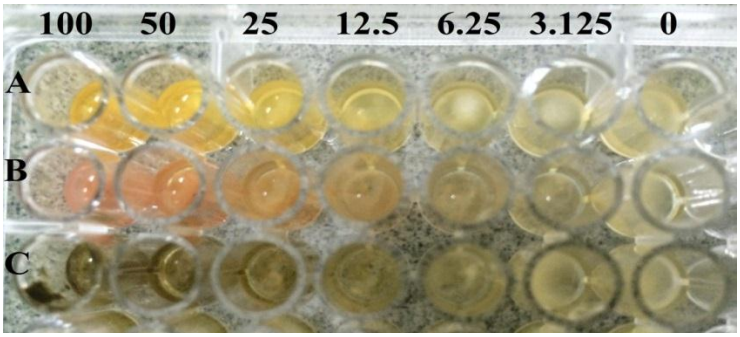
تجزیه واریانس با استفاده از نرم‌افزار SPSS (v.20) و مقایسه میانگین با استفاده از آزمون *t-test* در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

نتایج

بررسی اثر عصاره‌ها در جلوگیری از رشد قارچ *F. graminearum*

حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت

قارچ‌کشی (MFC) سه عصاره گیاهی در پلیت تعیین شد. نتیجه اثردهی غلظت‌های مختلف عصاره‌های شیرین‌بیان، دارچین و ریحان در جلوگیری از رشد قارچ *F. graminearum* دو روز پس از نگهداری در دمای ۲۸ درجه سلسیوس در شکل ۱ نشان داده شد. بررسی‌های نشان داد که در چاهک کنترل مثبت قارچ *F. graminearum* تمامی سطح چاهک را پوشاند و در سایر چاهک‌ها با افزایش غلظت عصاره‌ها میزان رشد قارچ کاهش یافته است و مقایسه چاهک‌ها با کنترل مثبت توانایی کنترل رشد قارچ توسط عصاره‌ها را اثبات کرد. چنانچه ملاحظه می‌شود MIC عصاره‌های شیرین-بیان، دارچین و ریحان به ترتیب ۲۵، ۵۰ و ۵۰ میلی-گرم در میلی‌لیتر تعیین شدند (جدول ۲). مقادیر MIC در محدوده ۲۵ تا ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بودند و عصاره شیرین‌بیان کمترین غلظت MIC (۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر) و عصاره‌های دارچین و ریحان بیشترین غلظت MIC (۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) را داشتند. اثر قارچ کشی غلظت‌های مختلف عصاره‌های شیرین‌بیان، دارچین و ریحان روی *F. graminearum* در شکل ۲ نشان داده شد. چنانچه ملاحظه می‌شود MFC عصاره-های شیرین‌بیان، دارچین و ریحان به ترتیب ۵۰، ۱۰۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین شدند (جدول ۲). عصاره شیرین‌بیان کمترین غلظت MFC (50 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و بالاترین خاصیت قارچ‌کشی روی *F. graminearum* را داشت.



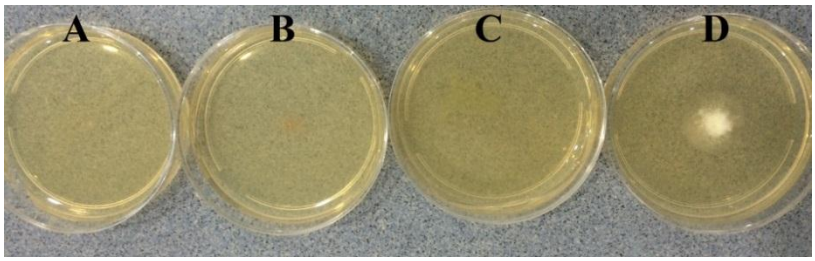
شکل ۱- سطح کلونی قارچ *Fusarium graminearum* در غلظت‌های مختلف عصاره‌های شیرین‌بیان (A)، دارچین (B)، ریحان (C) و کنترل مثبت (غلظت صفر)

Fig 1. The level of *Fusarium graminearum* colonies in different concentrations of extracts of *Glycyrrhiza glabra* (A), *Cinnamomum zeylanicum* (B), *Ocimum basilicum* (C) and positive control

جدول ۲- حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت قارچ‌کشی (MFC) عصاره‌های گیاهی در کنترل *Fusarium graminearum*

Plant species	MFC	MIC
Glycyrrhiza glabra	25	50
Cinnamomum zelanicum	50	100
Ocimum basilicum	50	100

Table 2. Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) of crude extracts from plant species against *Fusarium graminearum*

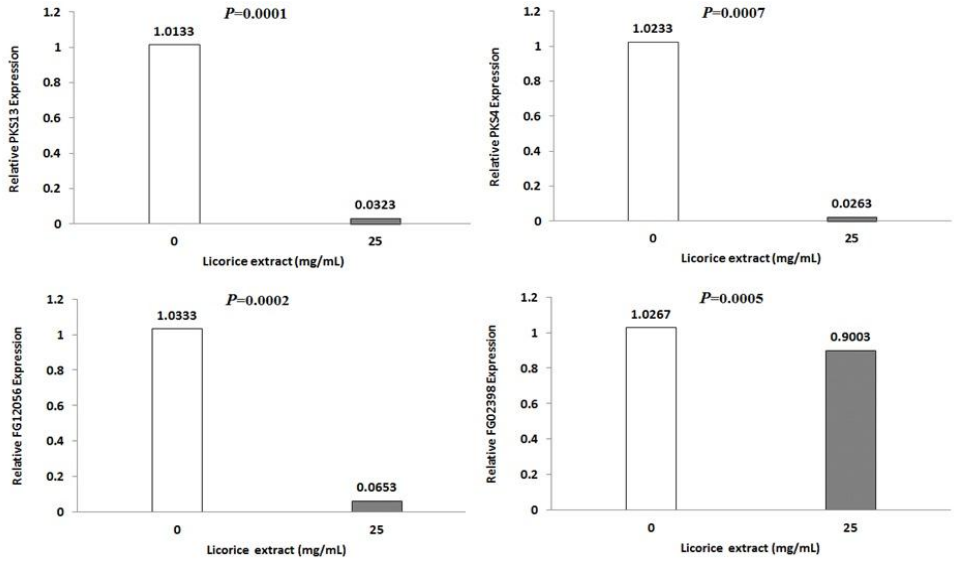


شکل ۲- نمونه حاوی ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره شیرین‌بیان (A)، نمونه حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم عصاره دارچین (B)، نمونه حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم عصاره ریحان (C)، نمونه کنترل مثبت (D)

Fig. 2. Sample containing 50 mg mL^{-1} of *Glycyrrhiza glabra* extract (A), a sample containing 100 mg mL^{-1} of *Cinnamomum zeylanicum* extract (B), a sample containing 100 mg mL^{-1} of *Ocimum basilicum* extract (C), a positive control (D)

بیان ژن‌های *PKS4*، *PKS13*، *FG12056* و *FG02398* تحت تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره شیرین‌بیان با تکنیک Real-Time PCR

نتایج بررسی میزان بیان ژن *PKS13* در نمونه‌های تیمار شده با عصاره شیرین‌بیان (با غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و غیرتیمار شده (شاهد) قارچ *F. graminearum* IRAN 124C در شکل ۳ مشاهده می‌شود. پس از تیمار با عصاره شیرین‌بیان کاهش زیادی (۹۶/۸٪) در سطح نسخه‌ای ژن *PKS13* مشاهده شد. نتایج اختلافات معنی‌داری را بین میزان بیان ژن *PKS13* در نمونه‌های تیمار شده و غیرتیمار شده در سطح ۵ درصد نشان داد. نتایج بررسی میزان بیان ژن *PKS4* در نمونه های تیمار شده با عصاره شیرین‌بیان (با غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و غیرتیمار شده (شاهد) قارچ *F. graminearum* در شکل (۳) مشاهده می‌شود. پس از تیمار با عصاره شیرین‌بیان کاهش زیادی (۹۷.۴٪) در سطح نسخه‌ای ژن *PKS4* مشاهده شد. نتایج اختلافات معنی‌داری را بین میزان بیان ژن *PKS4* در نمونه‌های تیمار شده و غیرتیمار شده در سطح ۵ درصد نشان داد. نتایج بررسی میزان بیان ژن *FG12056* در نمونه‌های تیمار شده با عصاره شیرین‌بیان (با غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و غیرتیمار شده (شاهد) قارچ *F. graminearum* در شکل ۳ مشاهده می‌شود. پس از تیمار با عصاره شیرین‌بیان کاهش زیادی (۹۳.۶٪) در سطح نسخه‌ای ژن *FG12056* مشاهده شد. نتایج اختلافات معنی‌داری را بین میزان بیان ژن *FG12056* در نمونه‌های تیمار شده و غیرتیمار شده در سطح ۵ درصد نشان داد. نتایج بررسی میزان بیان ژن *FG02398* در نمونه‌های تیمار شده با عصاره شیرین‌بیان (با غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و غیرتیمار شده (شاهد) قارچ *F. graminearum* در شکل۳ مشاهده می‌شود. پس از تیمار با عصاره شیرین‌بیان کاهش کمی (۱۲.۳٪) در سطح نسخه‌ای ژن *FG02398* مشاهده شد. نتایج، اختلافات معنی‌داری را بین میزان بیان ژن *FG02398* در نمونه‌های تیمار شده و غیرتیمار شده در سطح ۵ درصد نشان داد.



شکل ۳- میزان بیان ژن‌های *PKS4*، *PKS13*، *FG12056* و *FG02398* در نمونه‌های تیمار شده (با غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و غیرتیمار شده (شاهد) قارچ *Fusarium graminearum*. تغییرات نسبی بیان ژن‌های هدف نسبت به ژن *EF1a* نرمالایز شدند. سطوح mRNA ژن‌ها در نمونه‌های تیمار شده و شاهد تفاوت‌های معنی‌داری داشتند (P <0.05).

Fig. 3. Level of mRNA expression of *PKS13*, *PKS4*, *FG12056* and *FG02398* in the treated (25 mg mL^{-1}) and the non-treated (control) samples in *Fusarium graminearum*. Each sample is normalized for the amount of the template to the levels of *EF1a*. Significant differences were observed for mRNA levels for each of gene between the treated and the non-treated fungal cell (P <0.05).

بحث

در ایـن تحقیـق، خـواص ضـدقارچی عصـاره اتـانولی شیرین‌بیان علیـه یـک جدایـه توکسـین‌زای قـارچ *F. graminearum* و تاثیر آن در ارتبـاط بـا کـاهش بیـان ژن‌های اصلی مسیر زیست‌ساخت زیرالنون، یعنـی ژن-هـای *PKS4*، *PKS13*، *FG12056* و *FG02398* بررسـی شد. طبق گزارشات متعدد، شیرین‌بیان در غلظـت‌هـای خاصی دارای فعالیت ضدمیکروبی است. آبخو و جهـانی فعالیت‌های ضدقارچی عصاره اتانولی شیرین‌بیان را علیه *F. oxysporum* بررسی کردنـد (Abkhoo and Jahani 2017). عصاره اتانولی شیرین‌بیان اثر کنترل‌کننـدگی و قارچ‌کشی علیه *F. oxysporum* نشان داد کـه بـا نتـایج این تحقیق مشـابهت دارد. محسـنی و همکـاران تـأثیر بازدارندگی عصاره شیرین‌بیان را بر رشـد و بقـای قـارچ *Aspergillus parasiticus* بررسی کردند (Mohseni *et al*. 2012). نتایج نشان داد که با افزایش غلظت عصـاره شیرین‌بیان تولید پرگنـه قـارچ *A. parasiticus* کـاهش یافت و بالاترین غلظت کنترل‌کنندگی عصاره شـیرین-بیان ۵۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتـر بـود. همجـو و سـاتو فعالیت ضدقارچی عصاره متانولی شیرین‌بیان را بررسی کردنـد (Hojo and Sato ۲۰۰۲). نتـایج تحقیقـات آنهـا نشان داد که عصاره متانولی شیرین‌بیان اثر قارچ‌کشـی زیـادی علیـه *Arthrinium sacchari* و *Chaetomium funicola* دارد. گوپتا و همکارن پتانسیل ضـدباکتریایی عصـاره ریشـه شـیرین‌بیـان را بررسـی کردنـد. نتـایج تحقیقات آنها نشان داد عصاره ریشـه شـیرین‌بیـان در غلظـت ۵۰۰ میکروگـرم بـر میلـی‌لیتـر دارای اثـر ضـــدباکتریایی روی دو ســـویه (*Mycobacterium tuberculosis* $H_{37}Ra$ و $H_{37}Rv$ اسـت (Gupta *et al*. 2008). نـاریمن و همکـاران فعالیـت‌هـای ضـدباکتری عصاره شیرین بیان (*G. aspera*) را با اسـتفاده از روش حساسیت دیسک بررسی کردند. نتـایج تحقیقـات آنهـا نشان داد که عصاره شیرین‌بیان دارای اثر ضـدباکتریایی روی *Helicobacter pylori* اسـت (Nariman *et al*. 2004).

در این تحقیق عصاره شیرین بیان میزان بیـان ژن-های *PKS4*، *PKS13*، *FG12056* و *FG02398* را کاهش داد. ژن‌های *PKS4* و *PKS13* کد کننده دو آنـزیم پلـی کتید سینتاز (polyketide synthase) متفاوت می‌باشند که هر دو آنزیم برای تولیـد زیرالنـون ضـروری هسـتند (Gaffoor and Trail 2006, Kim *et al*. 2005, Lysoe *et al*. 2006) و ژن *FG12056* در مسیر زیسـت‌سـاخت زیرالنون مسـئول تبـدیل شـیمیایی بتـا-زیرالنـول (β-zearalenonol) به زیرالنون مـی‌باشـد و ژن *FG02398* نسخه‌برداری سـایر ژن‌هـای دخیـل در مسـیر زیسـت-ساخت زیرالنون را کنترل می‌کنـد (Kim *et al*. 2005). کالاگاتور و همکاران اثـر اسـانس ریحـان مقـدس (*O. sanctum* L) را بـر تولیـد زیرالنـون در قـارچ *F. graminearum* بررسـی کردنـد (Kalagatur *et al*. 2015). آنالیز qRT-PCR ژن‌های مسیر زیسـت‌سـاخت زیرالنون (*PKS4* و *PKS13*) نشـان داد کـه بـا افـزایش غلظت اسانس ریحان مقدس (۲۵۰ تا ۱۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) بطور معنـی‌داری بیـان ژن‌هـای *PKS4* و *PKS13* کاهش می‌یابد. به‌طور کلی نتایج ایـن تحقیـق نشان داد که عصاره شیرین‌بیان دارای خاصـیت قـارچ-کشی و کنترل‌کنندگی بر رشد قارچ *F. graminearum* است و میزان بیان ژن‌های اصلی در مسیر زیست‌ساخت زیرالنون را کاهش می‌دهد و از آنجایی که ایـن مطالعـه اولـین مطالعـه اصـلی و اساسـی در مـورد اثـر عصـاره شیرین‌بیان بر بیـان ژن‌هـای اصـلی در مسـیر زیسـت-سـاخت زیرالنـون اسـت، انجـام بررسـی‌هـای بیشـتر پیشنهاد می‌شود.

REFERENCES

Abkhoo J, Jahani S (2017) Efficacy of some medicinal plants extracts for potential antifungal activity. International Journal of Infection 4(1): e41156.

Abril M, Curry KJ, Smith BJ, Wedge DE (2008) Improved microassays used to test natural productbased and conventional fungicides on plant pathogenic fungi. Plant Disease 92: 106-112.

Bai GH, Shaner G (1994) Scab of wheat: prospect for control. Plant Disease 78: 760–766.

Bottalico A, Perrone G (2002) Toxigenic Fusarium species and mycotoxins associated with head blight in smallcereals in Europe. European Journal of Plant Pathology 108: 611–624.

Dube SP, Upadhay D, Tripathy SC (1989) Antifungal, physicochemical and insect repellant activity of

the essential oil of *Ocimum basilicum*. Canadian Journal of Botany 67: 2085–2087.

Eloff JN (1998) A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. Planta Medica 64:711-713.

Espinel-Ingroff A, Fothergill A, Peter J, Rinaldi MG, Walsh TJ (2002) Testing conditions for determination of minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for *Aspergillus* spp.: NCCLS Collaborative Study. Journal of Clinical Microbiology 40:3204-3208.

Fallahpour F, Koocheki A, Nassiri Mahallati M, Falahati Rastegar M, Ghorbani R (2010) Biological control of dodder (*Cuscuta campestris* L.) by fungi pathogens XML. Journal of Agroecology 2(3): 408-416.

Gaffoor I, Trail F (2006) Characterization of two polyketide synthase genes involved in zearalenone biosynthesis in *Gibberella zeae*. Applied and Environmental Microbiology 72:1793-1799.

Gagkaeva Tyu, Yli-Mattila T (2004) Genetic diversity of *Fusarium graminearum* in Europe and Asia. European Journal of Plant Pathology 110: 551–562.

Gupta VK, Fatima A, Faridi U, Negi AS, Shanker K, Kumar JK, Rahuja N, Luqman S, Sisodia BS, Saikia D, Darokar MP, Khanuja SP (2008) Antimicrobial potential of *Glycyrrhiza glabra* roots. Journal of Ethnopharmacology 116(2): 377-380.

Hojo H, Sato J (2002) Antifungal Activity of Licorice (*Glycyrrhiza glabra* Linn) and potential applications in beverage foods. Foods & Food Ingredients Journal of Japan 203: 45-9.

Jahani S, Saeidi S, Javadian F, Akbarizadeh Z, Sobhanizade A (2016) Investigating the antibacterial effects of plant extracts on *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. International Journal of Infection 3(2): e34081.

Kalagatur N, Mudili V, Siddaiah C, Gupta VK, Natarajan G, Sreepathi MH, Vardhan BH, Putcha VLR (2015) Antagonistic activity of *Ocimum sanctum* L. essential oil on growth and zearalenone production by *Fusarium graminearum* in maize grains. Frontiers in Microbiology 6: 892.

Kim YT, Lee YR, Jin JM, Han KH, Kim H, Kim JC, Lee T, Yun SH, Lee YW (2005) Two different polyketide synthase genes are required for synthesis of zearalenone in *Gibberella zeae*. Molecular Microbiology 58: 1102-1113.

Kim HK, Yun SH (2011) Evaluation of potential reference genes for quantitative RT-PCR analysis in *Fusarium graminearum* under different culture conditions. Plant Pathology Journal 27(4): 301-309.

Lysøe E, Klemsdal SS, Bone KR, Frandsen RJN, Johansen T, Thrane U, Giese H (2006) The *PKS4* gene of *Fusarium graminearum* is essential for zearalenone production. Applied and Environmental Microbiology 72: 3924-3932.

Lysøe E, Bone KR, Klemsdal SS (2009) Real-time quantitative expression studies of the zearalenone biosynthetic gene cluster in *Fusarium graminearum*. Phytopathology 99: 176-84.

McMullen M, Jones R, Gallenberg D (1997) Scab of wheat and barley: a reemerging disease of devastating impact. Plant Disease 81: 1340-1348.

Mohseni R, Nasrollahi Omran A, Norbakhsh F, Rezaie S, Hosseinjani H (2012) A survey of the effect of licorice plant extract on aflR gene expression and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus* via real-time PCR. Modares Journal of Medical Sciences: Pathobiology 15(3): 63-77.

Nariman F, Eftekhar F, Habibi Z, Falsafi T (2004) Anti-*Helicobacter pylori* activities of six Iranian plants. Helicobacter 9(2): 146-51.

Nitalikar MM, Munde KC, Dhore BV, Shikalgar SN (2010) Studies of antibacterial activities of *Glycyrrhiza glabra* root extract. International Journal of PharmTech Research 2(1): 899-901.

Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST[a]) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nucleic Acids Research 9:1–10.

Ranasinghe L, Jayawardena B, Abeywickrama K (2002) Fungicidal activity of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* (L.) and *Syzygium aromaticum* (L.) Merr et L.M. Perry against crown rot and anthracnose pathogens isolated from banana. Letters in Applied Microbiology 35: 208-21.

Zinedine A, Soriano JM, Molto JC, Manes J (2007) Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. Food and Chemical Toxicology 45: 1–18.