نقش زودخندانی در آلودگی میوه پسته به گونه‌های آسپرژیلوس و آفلاتوکسین در استان کرمان

سید رضا فانی[a]، محمد مرادی[b*]، علی تاج آبادی پور[c]، رزا درگاهی[d]، منصوره میرابوالفتحی[e]

[a] کارشناس ارشد بخش گیاه پزشکی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی یزد، یزد، ایران
[b] استادیار پژوهش مؤسسه تحقیقات پسته کشور، رفسنجان، ایران
[c] مربی پژوهش مؤسسه تحقیقات پسته کشور، رفسنجان، ایران
[d] کارشناس ارشد مؤسسه تحقیقات پسته کشور، رفسنجان، ایران
[e] استاد پژوهش بخش تحقیقات بیماری های گیاهی، مؤسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور، تهران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۹/۲ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۱۰/۱۵

چکیده

مقدمه: پسته‌های زودخندان از مهم ترین منابع آلودگی پسته به آفلاتوکسین در باغ و مراحل فرآوری این محصول به شمار می‌روند. در این پژوهش ویژگی‌های مختلف پسته‌های ترک‌خورده و میزان آلودگی آنها به قارچها و آفلاتوکسین مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش ها: ویژگی‌های مختلف پسته‌های زودخندان شامل خصوصیات ظاهری، آلودگی به قارچهای گروه *Aspergillus flavus* و *A. niger* و مقدار آفلاتوکسین با روش‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. آزمایشات روی سه رقم تجاری پسته شامل اوحدی، کله قوچی و احمد آقایی از دو باغ مختلف انجام گرفت و نتایج حاصل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با استفاده از نرم افزار Mstatc تجزیه و تحلیل آماری شد.

یافته‌ها: از نظر کلی بیشترین میزان آلودگی به گونه‌های مختلف قارچ آسپرژیلوس مربوط به پسته‌های زودخندان با پوست سبز خشک و نیمه‌خشک با دامنه تغییرات ۱/۴ تا ۶۶/۵٪ بود. پسته‌های زودخندان با پوست سبز خشک و نیمه‌خشک همچنین بیشترین فراوانی آلودگی به شب‌پره خرنوب (۱/۹-۵۴/۵٪) و رنگ‌گیری پوست استخوانی (۳۰-۸۶٪) و کمترین وزن مغز (۰-۰/۳ گرم در دانه) را به خود اختصاص دادند. میوه‌های پسته زودخندان با پوست نرم رویی نیز سطوح مختلفی از آلودگی را نشان دادند که میزان آلودگی قارچی در آنها از ۰/۷۵ تا ۱۰/۳٪، شب‌پره خرنوب ۱/۵ تا۹/۵٪ و میزان رنگ‌گیری ۲۱/۵ تا ۴۴/۱ متغیر بود.این موضوع نشان دهنده اهمیت پسته‌های زودخندان و زمان تشکیل آنها در ریسک آلودگی میوه پسته به آفلاتوکسین می‌باشد. آلودگی به شب‌پره‌خرنوب باعث افزایش سطوح آلودگی به قارچهای گروه *A. flavus* و*A. niger* شده بود. آلودگی به قارچها، شب‌پره خرنوب و مورچه باعث کاهش وزن مغز میوه های پسته گردیده بود. نتایج نشان داد که پوست سبز پسته عاری از آفلاتوکسین‌ها می‌باشد، در حالی‌که پوست استخوانی و مغز حاوی سطوح متفاوت آفلاتوکسین‌ها بودند. مقایسه توانایی تولید آفلاتوکسین در جدایه‌ها مشخص نمود که ۶۷ درصد جدایه‌ها تولید آفلاتوکسین های B_1 و B_2، ۲۴ درصد تولید آفلاتوکسین B_1 و ۹ درصد قادر به تولید آفلاتوکسین نبودند.

نتیجه‌گیری: استفاده از خصوصیات ظاهری و فیزیکی پسته‌های آلوده جهت جداسازی آنها در فرآوری و یا پس از آن می تواند در کاهش سطوح آلودگی پسته‌های فرآوری شده موثر واقع گردد. نتایج نشان دهنده نقش کلیدی برداشت زودتر در کاهش سطوح آلودگی و مقدار آفلاتوکسین می‌باشد. حدود ۹۵ و ۵ درصد از آفلاتوکسین اندازه گیری شده به ترتیب مربوط به مغز و پوست استخوانی بود و برای اندازه‌گیری دقیق آفلاتوکسین بهتر است پوست استخوانی از سنجش‌های مربوطه حذف گردد.

واژه‌های کلیدی: *ایمنی غذایی، آفلاتوکسین، آسپرژیلوس، پسته، فرآوری، زودخندانی*

[*] نویسنده مسئول مکاتبات email: moradi@pri.ir

مقدمه

مایکوتوکسین‌ها ترکیباتی هستند که توسط تعدادی از جدایه‌های مختلف گونه‌های قارچی تولید شده و برای سلامتی انسان و حیوانات خطرناک می‌باشند. رشد این قارچ‌ها روی خوراک دام و مواد غذایی (مانند پسته، بادام زمینی، ذرت، سویا و گندم) باعث تولید آفلاتوکسین می‌گردد، که مصرف آنها می‌توانند باعث نکروز بافتی، سیروز و سرطان کبد گردد. علائم بالینی مشاهده شده در انسان شامل استفراغ، درد شکم، ضایعات حاد کبد مثل تغییرات چربی، ادم ریوی، لرزش عضلانی، کما، تشنج ومرگ همراه با ادم مغز ودرگیری اندام‌هایی نظیر کبد ،کلیه و قلب می‌باشد. آفلاتوکسین B1 از عوامل ایجاد ناهنجاری، جهش و سرطان است (Richard & Payne, 2003). به همین دلیل امروزه توجه جامعه بشری به این موضوع بیشتر شده و باعث اعمال محدودیت‌های زیادی در فرآیند تولید و مصرف فرآورده‌های گوناگون شده است. کشورهای مختلف با توجه به عوامل داخلی و خارجی، سطوح آستانه‌ای مختلفی را برای انواع مایکوتوکسین‌ها وضع کرده‌اند. مهم‌ترین تولید کننده آفلاتوکسین‌ها، جدایه‌های متعلق به چندین گونه قارچ آسپرژیلوس به ویژه *A. flavus* است. جنس آسپرژیلوس دارای بیش از ۲۰۰ گونه می‌باشد. گونه‌های مختلف این قارچ دارای دامنه انتشار وسیع بوده و از نواحی قطبی تا نواحی گرم حاره‌ای یافت می‌شوند. گونه‌های جنس آسپرژیلوس قادر به ترشح انواع زیادی‌آنزیم هستند، از این رو این دسته از قارچ‌ها می‌توانند روی انواع بی‌شماری از مواد غذایی رشدکنند. در حقیقت به سختی می‌توان یک محیط غذایی حاوی مقداری ماده آلی و مختصری رطوبت را پیدا نمود که گونه‌های آسپرژیلوس نتوانند روی آن رشد کنند. بدین ترتیب گونه‌های آسپرژیلوس به طرق مختلفی بر زندگی انسان تأثیر می‌گذارند (Amaike & Keller, 2011).

وجود *A. flavus* روی میوه‌های پسته در حال رشد قبل از برداشت به اثبات رسیده است (مرادی و میرابوالفتحی، ۱۳۸۶; Thomson and Mehdy, 1978; Moradi & Hokmabadi, 2011) و گزارش شده که آلودگی با در معرض قرار گرفتن مغز میوه پسته در اثر شکاف خوردن پوست سبز با اسپورهای هوابر ارتباط دارد (Moradi *et al*., 2010). همچنین مشخص گردیده است آلودگی به *A. flavus* و *A. parasiticus* و آفلاتوکسین در پسته‌های زودخندان[1] آلوده به پروانه آفت navel orange worm (Amyelois transitella) بیشتر از پسته‌های زودخندان غیرآلوده به NOW است و پسته‌های دارای پوست سبز سالم (بدون ترک‌خوردگی) و پسته‌های دهن بست عاری از آفلاتوکسین هستند (Sommer, 1986).

بررسی وضعیت آلودگی انواع پسته‌های زودخندان و ترک خورده نامنظم نشان داد که پسته‌های زودخندان با پوست رویی چروکیده بیشتر از دو برابر در مقایسه با پسته‌های زودخندان با پوست رویی نرم، به *A. niger* و بیشتر از ۳ برابر به *A. parasiticus* و *A. flavus* آلوده بودند. پسته‌های‌آلوده به *A. transitella* نیز ۸۴ درصد کل آفلاتوکسین را به خود اختصاص دادند. پوست سبز پسته‌های زودخندان اغلب مقدار کمی آفلاتوکسین داشت (Doster & Michailides, 1995).

آلودگی پسته‌های زود خندانی که زودتر خندان شده بودند سه برابر بیشتر از آنهایی بود که در فاصله زمانی کوتاهی قبل از برداشت خندان شده بودند. ۱۵ تا ۴۵ درصد پسته‌های زودخندان ۴ هفته قبل از برداشت و ۱۰ تا ۳۰ درصد آنها ۲ هفته قبل از برداشت خندان شده بودند (Doster & Michailides, 1993). بررسی خصوصیات ظاهری پوست استخوانی در مراحل برداشت و فرآوری نشان داد که میوه‌های پسته با پوست رویی ترک خورده از نظر رنگ‌گیری پوست استخوانی متنوع می‌باشند و در هر دو نوع ترک خوردگی مقدار رنگ‌گیری پوست استخوانی افزایش می‌یابد. آلودگی قارچی و پروانه آفت navel orange worm در پسته‌هایی که پوست استخوانی آنها فاقد لکه بود مشاهد نگردید و یا آلودگی آنها خیلی کم بود. میوه‌های دارای پوست استخوانی با ظاهر روغنی بالاترین مقادیر آلودگی به پوسیدگی قارچی و پروانه آفت navel orange worm را به خود اختصاص داده بودند (Doster & Michailides, 1999).

[1] Early split

مهم‌ترین اقدام برای کاهش آلودگی آفلاتوکسین در پسته تعیین منابع آلودگی و ویژگی‌های ظاهری آنها در مراحل مختلف و غربال سازی جهت کاهش ریسک آلودگی پسته تولید شده به آفلاتوکسین‌ها می‌باشد (Moradi & Hokmabadi, 2011; Doster & Michailides, 1999; Moradi & Javanshah, 2006; Shakerardekani *et al*., 2012). ترک خوردگی زود هنگام پسته که یکی از منابع آلودگی است در پسته‌هایی پیش می‌آید که وضعیتی طبیعی ندارند و پوست رویی آنها در طول شیار خندانی پوست استخوانی شکاف بر می‌دارد و این امر باعث می شود که مغز پسته در معرض کپک‌ها و حشرات آفت قرار گیرد (Thomson & Mehdy, 1978; Moradi & Hokmabadi, 2011; Doster & Michailides, 1999). با توجه به اینکه تاکنون تحقیقی در خصوص آلودگی پسته‌های زودخندان به قارچ‌ها، آفلاتوکسین و آفات صورت نگرفته است. هدف از اجرای این تحقیق بررسی نقش پسته‌های زود خندان در باغ از نظر میزان آلودگی به قارچ‌های گروه *A. flavus* و آفلاتوکسین‌ها، و بررسی احتمال وجود رابطه‌ای بین میزان آلودگی و خصوصیات ظاهری پوست استخوانی در انواع پسته‌های زود خندان و آلودگی به آفات مهم میوه بود. همچنین مقدار آفلاتوکسین در اجزاء مختلف میوه در پسته‌های زود خندان سه رقم مهم تجاری نیز مورد مقایسه قرار گرفت. در این بررسی، توانایی جدایه‌های مختلف قارچ *A. flavus* جداسازی شده از میوه پسته در تولید آفلاتوکسین نیز بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

- انتخاب باغ و بررسی پسته‌های زود خندان

دو باغ پسته دارای سه رقم تجارتی اوحدی، کله قوچی و احمدآقایی با مدیریت صحیح باغبانی، آبیاری، تغذیه و کنترل آفات در دو ناحیه رفسنجان شامل منطقه کشکوئیه (باغ شماره۱) و منطقه نوق (باغ شماره ۲) انتخاب شدند. در هر منطقه تعداد پنج درخت از هر رقم بطور تصادفی انتخاب و پلاک‌گذاری شدند، درختان مورد نظر دارای سنین تقریباً یکسانی (حدود ۲۵ سال) بودند. محصول درختان پلاک‌گذاری شده در آخر شهریور ماه هر سال برداشت گردید. در طی دو سال آزمایش کلیه پسته‌های برداشت شده مورد بازبینی قرار گرفته و پسته‌های زودخندان هر درخت جداسازی شدند. پسته‌های زود خندان از لحاظ ظاهر پوست سبز رویی به سه گروه پسته‌های زودخندان با پوست نرم و صاف، پسته‌های زودخندان با پوست چروکیده و نیمه خشک و پسته‌های زودخندان با پوست خشک تقسیم‌بندی شدند. وزن مغز پسته‌های هر گروه بطور جداگانه بوسیله ترازو با دقت ۰/۰۰۱ گرم توزین گردید. میزان رنگ‌گیری به صورت چشمی و با دقت بالا بر اساس درصد از کل سطح پوست اسخوانی تخمین زده شد و بر این اساس در گروه‌های مختلف قرارگرفتند.

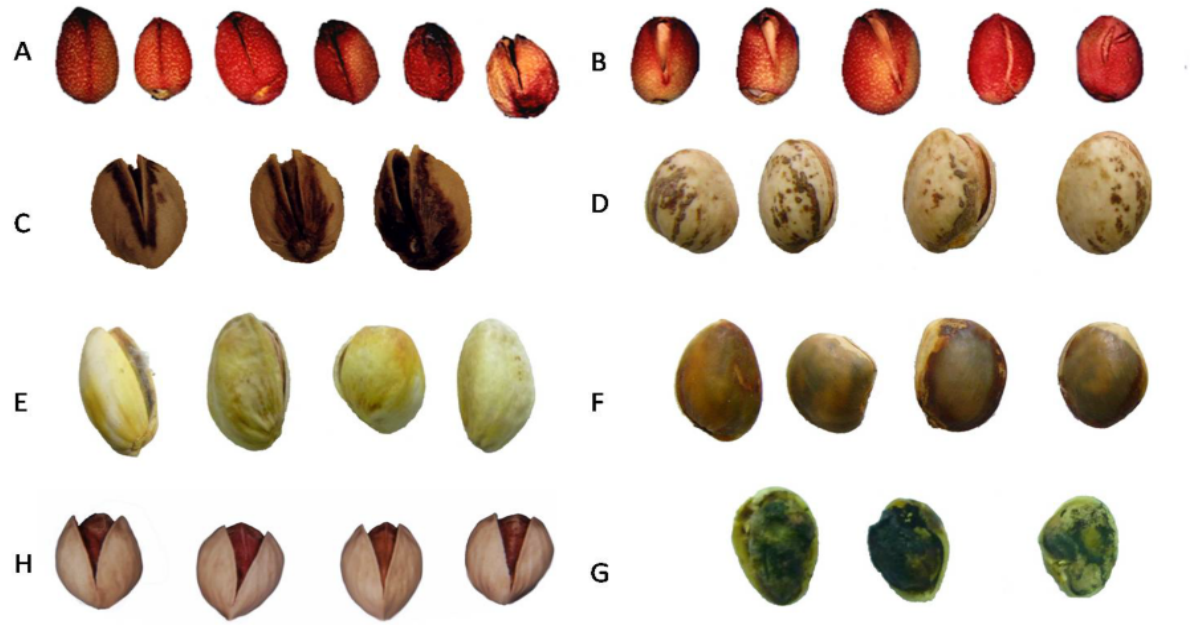
- بررسی‌های قارچی و آفات

برای تعیین درصد آلودگی مغز به آفات و قارچ ها، ابتدا پوست استخوانی آنها جدا گردید. با استفاده از بینوکولر با بزرگنمایی متغیر (10x) آلودگی مغز از نظر وجود شب پره خرنوب (*Apomyelois ceratoniae*) و آلودگی قارچی تعیین گردید. در صورت وجود آلودگی قارچی، ساختار تولید کنیدی با استفاده از بینوکولر با بزرگنمایی بالاتر (۶۰x) بررسی شد (Doster & Michailides, 1999). جدایه‌های متعلق به گروه *A. flavus* جدا و سپس خالص‌سازی شدند. شناسایی مرفولوژیک جدایه‌ها بر اساس ویژه گی‌های شکل، رنگ، و اندازه ی کنیدیوفور، کنیدی، وزیکول، سلول پایه و همچنین مشخصات استریگماتا و رشد در محیط های کشت و دماهای مختلف ارائه شده در کلید تشخیص گونه صورت گرفت (Klich, 2002). لازم به ذکر است که از واژه گروه برای نشان دادن کل جمعیت‌های متعلق به *Aspergilli section Flavi* و یا *Aspergilli section nigri* استفاده گردید.

- اندازه‌گیری آفلاتوکسین در نمونه‌های پسته و جدایه‌های *A. flavus*

برای اندازه‌گیری آفلاتوکسین در نمونه‌های پسته و همچنین توانایی تولید آفلاتوکسین در ۲۷۰ جدایه گونه *A. flavus* از روش کروماتوگرافی لایه نازک با کارایی بالا (HPTLC) استفاده گردید. جدایه‌ها در ابتدا در لوله‌های آزمایش حاوی محیط Potato Dextrose Agar (PDA; Merck, Germany) به صورت شیب‌دار کشت و به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۵ درجه

سلسیوس نگهداری شدند تا کاملا" اسپورزایی صورت گیرد. برای بررسی توانایی تولید آفلاتوکسین در جدایه‌ها از بستر آرد برنج استفاده گردید (Wei and Jong, 1986). برای استخراج آفلاتوکسین، به ازای هرگرم از نمونه پسته ۵ میلی‌لیتر متانول ۵۵٪، ۲ میلی لیتر ان- هگزان و۸۰ میلی‌گرم کلرید سدیم و برای برنج به محتوای هر ارلن (۱۰ گرم آرد برنج) ۳ گرم کلرید سدیم و ۱۲۵ میلی لیتر متانول ۵۵٪ اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت ۴۵-۳۰ دقیقه با استفاده از دستگاه شیکر با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه به هم زده شدند. پس از صاف نمودن مخلوط حاصله، محلول استخراج شده داخل قیف جدا کننده ریخته شد و هم حجم آن کلروفرم اضافه شد. محتوای هر قیف جداکننده حداقل ۳ دقیقه به شدت هم زده شد تا انتقال آفلاتوکسین از فاز متانولی به فاز کلروفرم به طور کامل انجام پذیرد. پس از جدا شدن کامل دوفاز موجود در قیف جداکننده، لایه مربوط به فاز کلروفرمی خارج و اقدام به تبخیر حلال آن توسط سیستم تبخیر کننده دوار در دمای ۴۰ درجه سلسیوس گردید تا زمانیکه حجم محلول به حدود ۱ میلی لیتر رسید. در ادامه کار، مقدار باقیمانده به یک ویال کوچک منتقل گردید و تبخیر کامل حلال به وسیله عبور گاز نیتروژن از روی محلول تغلیظ شده انجام شد. به منظور آنالیز سم آفلاتوکسین موجود در نمونه‌ها، به هر ویال ۴۰۰ میکرولیتر حلال نقطه‌گذاری برای پسته (شامل مخلوطی از هگزان، کلروفرم و استون با نسبتهای حجمی ۹۰ : ۵ : ۵) و بدون ان- هگزان برای برنج اضافه و محتوای آن ورتکس شد. سپس به کمک سرنگ مخصوص نقطه‌گذاری (Capillary dispenser) روی صفحه سیلیکاژل HPTLC (F_{254}) نقطه‌گذاری گردید. جهت شناسایی آفلاتوکسین، روی هر پلیت مخلوطی از استانداردهای آفلاتوکسین های گروه B و G نیز نقطه‌گذاری گردید. پس از آن پلیت‌ها در تانک حاوی حلال جداسازی و ظهور شامل مخلوطی از کلروفرم و استون با نسبت حجمی ۹۰: ۱۰ و در تاریکی قرار داده شدند. پس از جداسازی اجزاء نمونه (زمانی که سطح فاز متحرک به حدود ۲- ۱ سانتیمتری انتهای فوقانی پلیت رسید)، برای تبخیر فاز متحرک پلیت‌ها مدت کوتاهی در تاریکی نگهداری شدند و سپس تحت طول موج ۳۶۶ نانومتر اشعه فرابنفش در دستگاه (UV Cabinet, CAMAG, witzerland)



شکل ۱- خصوصیات ظاهری انواع پسته‌های ترک خورده آلوده قارچ‌ها و آفات به در قبل از برداشت و پس از فرآوری که ممکن است در یک توده پسته وجود داشته باشند

A: پسته‌های زودخندان با پوست سبز نرم و خشک؛**B**: پسته‌های ترک‌خورده نامنظم؛ **C**: رنگ‌گیری پوست استخوانی در پسته‌های زودخندان؛ **D**: رنگ‌گیری پوست استخوانی در پسته‌های ترک خورده نامنظم؛ **F**: پسته‌های لکه روغنی؛ **E**: پسته‌ها با پوست استخوانی زرد رنگ؛ **G**: آلودگی شدید به قارچ‌های گروه *Aspergillus niger* در پسته‌های لکه روغنی؛ **H**: پسته‌های سالم –بدون رنگ گیری پوست استخوانی

قرار گرفتند. از دستگاه چگالی‌سنج (Scanner3, CAMAG, Switzerland) و نرم افزار CATS نیز برای اندازه‌گیری میزان افلاتوکسین در نمونه‌ها استفاده گردید (Trucksess, 2000). برای اطمینان از عدم توانایی تولید آفلاتوکسین‌ها در جدایه‌های غیرتوکسین‌زا، آزمایش دو بار تکرار شد. مقدار آفلاتوکسین در اجزاء پسته‌های زودخندان شامل پوست رویی، پوست استخوانی و مغز به صورت جداگانه اندازه‌گیری گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های بدست آمده بعد از تبدیل داده مناسب در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی توسط نرم افزار آماری Mstatc مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن در سطح احتمال ۵٪ انجام شد.

یافته‌ها

- نتایج حاصل از بررسی آلودگی مغز پسته به قارچ‌های گروه *A. flavus* و *A. niger*، آلودگی به شب‌پره خرنوب

(*A. ceratoniae*)، درصد رنگ‌گیری پوست استخوانی و غلظت آفلاتوکسین در پسته با پوست سبز ترک‌خورده نرم و با پوست سبز ترک‌خورده خشک، زودخندان نرم و زودخندان خشک، بدون ترک‌خوردگی و مقایسه غلظت آفلاتوکسین در اجزاء مختلف میوه پسته در ارقام کله‌قوچی، اوحدی و احمد آقایی در جداول ۱ تا ۴ آمده است.

جدول۱ - مقایسه خصوصیات ظاهری و آلودگی پسته های زودخندان نرم، نیمه خشک و خشک به قارچ‌های گروه *Aspergillus flavus* و*Aspergillus niger* و آفات در رقم کله قوچی

باغ	نوع زودخندانی	رنگ گیری پوست اسخوانی (درصد)	آلودگی به *Aspergilli* section *Flavi* (درصد)	آلودگی به *Aspergilli* section *Nigri* (درصد)	وزن مغز در دانه (گرم)	وزن پوست استخوانی (گرم)	آلودگی به خرنوب (درصد)	آلودگی به مورچه (درصد)
شماره یک	نرم	۲۷/۹A	۵/۹ C	۱/۴ C	۰/۴۲۰ AB	۰/۳۲۵ Ab	۲/۵ C	۲/۸
	نیمه خشک	۳۶/۸ A	۳۳/۳ AB	۵۳/۰AB	۰/۳۵۰ B	۰/۳۱۵ Ab	۴۱/۷ AB	
	خشک	۵۱/۰ A	۳۴/۰ A	۶۶/۵ A	۰/۱۹۸ C	۰/۱۹ C	۵۴/۵ A	
شماره دو	نرم	۳۶/۱ A	۱/۶ C	۷/۳ C	۰/۵۰۴ A	۰/۳۵۸ A	۸/۳ C	
	نیمه خشک	۴۰/۷ A	۲۱/۴ AB	۲۳/۵ B	۰/۳۴۰B	۰/۳۵ AB	۳۵/۸ AB	
	خشک	۵۰/۰ A	۱۹/۵B	۱۸/۱ B	۰/۳۰۸ BC	۰/۲۵۸ BC	۲۲/۹ AB	

در هر ستون اعدادی که دارای حروف متفاوت هستند از نظر آماری در سطح ۵٪ با استفاده از آزمون دانکن معنی دار می باشند.

جدول۲ - مقایسه خصوصیات ظاهری و آلودگی پسته های زودخندان نرم، نیمه خشک و خشک به قارچ‌های گروه *Aspergillus flavus* و Aspergillus niger و آفات در رقم اوحدی

باغ	نوع زودخندانی	رنگ‌گیری پوست اسخوانی (درصد)	آلودگی به *Aspergilli section Flavi* (درصد)	آلودگی به *Aspergilli section Nigri* (درصد)	وزن مغز در دانه (گرم)	وزن پوست استخوانی در دانه (گرم)	آلودگی به خرنوب (درصد)	آلودگی به مورچه (درصد)
شماره یک	نرم	۴۴/۱ B	۲/۱ C	۱۰/۳ CD	۰/۳۸۷ A	۰/۳۱۰ A	۹/۵ C	
	نیمه خشک	۷۷ A	۹/۰ BC	۲۸/۵ AB	۰/۲۶۵ A	۰/۳۲۸ A	۲۴/۴ Ab	
	خشک	۸۶/۷ A	۱۴/۰۵ B	۳۹/۵ A	۰/۲۵۳ AB	۰/۲۳۲ A	۲۹/۰ A	
شماره دو	نرم	۴۳/۱ B	۸/۶ BC	۶/۷۱ D	۰/۲۵۶ AB	۰/۲۴۵ A	۶/۰ C	۲/۰۵
	نیمه خشک	۷۴/۳۵ A	۲۲/۰۵ A	۲۸/۰ AB	۰/۲۵ AB	۰/۲۴۰ A	۷/۰BC	۱۸
	خشک	۷۵ A	۱۵/۵ AB	۲۴/۰ BC	۰/۱۱۹ B	۰/۲۷۸ A	۲۲/۷ ABC	۱۳

در هر ستون اعدادی که دارای حروف متفاوت هستند از نظر آماری در سطح ۵٪ با استفاده از آزمون دانکن معنی دار می باشند.

جدول۳- مقایسه خصوصیات ظاهری و آلودگی پسته های زودخندان نرم، نیمه خشک و خشک به قارچ‌های گروه *Aspergillus flavus* و *Aspergillus niger* و آفات در رقم احمد آقایی

نام باغ	نوع زودخندانی	رنگ گیری پوست استخوانی (درصد)	آلودگی به *Aspergilli section Flavi* (درصد)	آلودگی به *Aspergilli section Nigri* (درصد)	وزن مغز در دانه (گرم)	وزن پوست استخوانی در دانه (گرم)	آلودگی به خرنوب (درصد)	آلودگی به مورچه (درصد)
	نرم	۲۱/۵ C	۰/۸ B	۳/۴ CD	۰/۳۷۳ AB	۰/۳۲۳ AB	۱/۵ C	۳
شماره یک	نیمه خشک	۳۵/۵ BC	۲/۰A	۱۵/۵C	۰/۲۹۴ BC	۰/۲۹۳ AB	۱/۹ C	۷/۵
	خشک	۵۲ AB	۱/۴AB	۳۳/۰ B	۰/۱۸۳ C	۰/۳۰۴ B	۲۰/۰ B	۱۸
	نرم	۲۲ C	۰/۱ B	۵/۰ CD	۰/۴۷۵ A	۰/۴۴۲ A	۹/۷ C	
شماره دو	نیمه خشک	۳۰ BC	۰/۰ B	۵۰/۰ A	۰/۰۰۰ D	۰/۲۰۰ B	۵۰/۰ A	
	خشک	۶۳ A	۲/۰ AB	۲/۰ D	۰/۲۳۵ C	۰/۱۷۵ B	۳/۱ C	

در هر ستون اعدادی که دارای حروف متفاوت هستند از لحاظ آماری در سطح ۵٪ با استفاده از آزمون دانکن معنی دار می باشند.

جدول ٤ – مقایسه میزان آفلاتوکسین کل (ng/g) در اجزاء مختلف میوه پسته زودخندان در ارقام اوحدی، کله قوچی و احمد آقایی

اجزاء میوه	باغ شماره یک			باغ شماره دو		
	اوحدی	کله قوچی	احمدآقایی	اوحدی	کله قوچی	احمدآقایی
پوست سبز	۰/۰G	۰/۰ G	۰/۰ G	۰/۰ G	۰/۰ G	۰/۰ G
پوست استخوانی	۳۸۵/۴ CD	۱/۴ FG	۴۷/۲ EF	۳۱/۹ E	۱۳۵/۷ CDE	۱۷/۱ EFG
مغز	۷۰۲/۰ CD	۶۴۶/۵ CD	۳۱۱۰/۰ AB	۴۳۴۷/۰ A	۲۸۲۰/۰ AB	۸۹۳/۹ BC

اعدادی که دارای حروف مشترک می باشند از نظر آزمون دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ معنی دار نمی باشند.

جداول ۱ تا ۳ نشان می‌دهند که آلودگی به قارچ‌های گروه *A. flavus* و *A. niger* و شب‌پره خرنوب، به ترتیب در میوه‌های پسته زودخندان با پوست سبزخشک، نیمه‌خشک و نرم کاهش می‌یابد، هر چند ممکن است در بعضی موارد درصد آلودگی پسته‌های نیمه‌خشک به قارچ‌های مورد مطالعه و آفات از نظر آماری با میوه‌های پسته با پوست سبزخشک تفاوتی نداشته یا بیشتر باشد (باغ شماره ۲). به طور کلی بیشترین فراوانی آلودگی به شب‌پره خرنوب مربوط به پسته‌های زودخندان خشک (باغ شماره ۱) با دامنه میانگین تغییرات ۳/۱۲ تا ۵۴/۴۵ و نیمه خشک (باغ شماره ۲) با دامنه میانگین تغییرات ۱/۹ تا ۵۰ بود. آلودگی به شب‌پره خرنوب سبب افزایش فراوانی آلودگی به قارچ‌های مورد مطالعه در باغ‌های نمونه‌برداری شده بود. آلودگی به شب‌پره خرنوب و مورچه باعث کاهش وزن مغز میوه‌های پسته شده (جداول ۱ تا ۳)، و در آلودگی ۵۰ درصد هیچ گونه مغزی در پسته‌های مورد بررسی باقی نمانده بود. با افزایش آلودگی میوه پسته به شب‌پره خرنوب، فراوانی آلودگی به قارچ‌های گروه *A. flavus* و *A. niger* نیز افزایش می‌یافت. نتایج نشان داد که آلودگی پسته‌های زود خندان نرم به قارچ‌های مورد مطالعه و شب پره خرنوب به ترتیب بین ۰/۱ تا ۱۰/۳٪ و ۲۴۵/ تا ۹/۷ ٪ متغیر بود. مقدار رنگ‌گیری پوست استخوانی در پسته‌های زودخندان خشک و نیمه‌خشک از نظر آماری تفاوت معنی‌داری نداشتند، اما رنگ پوست استخوانی در این دو نوع زودخندانی در سطح معنی‌داری بیشتر از پسته‌های زودخندان نرم بود. این موضوع برای مقایسه سایر صفات دیگر اندازه گیری شده بین انواع پسته‌های زودخندان نیز صادق بود. در تمامی ارقام مورد بررسی وزن خشک پسته‌های زودخندان خشک و نیمه‌خشک از نظر آماری تفاوت معنی داری در سطح ۵ درصد نداشتند. میوه‌های پسته زودخندانی که در فاصله زمانی بیشتر نسبت به زمان برداشت تشکیل شده بودند، آلودگی بیشتری به شب پره خرنوب، مورچه، قارچ‌های گروه *A. flavus* و *A. niger* و رنگ‌گیری پوست استخوانی داشتند و فراوانی قارچ‌های گروه *A. niger* بیشتر از قارچ‌های گروه *A. flavus* بود. اگرچه جمعیت قارچ‌های گروه *A. flavus* با فراوانی پایین مشاهده گردید، ولی به دلیل توانایی تولید آفلاتوکسین‌ها از اهمیت خاصی برخوردار هستند.

مقایسه اجزاء مختلف میوه های پسته فوق الذکر نشان داد که میزان آفلاتوکسین کل (B_1, B_2, G_1, G_2)

در مغز بیشتر از پوست استخوانی بود (جدول ۴). در پوست سبز هیچ یک از نمونه‌های مورد بررسی آفلاتوکسین ردیابی نشد، در حالی‌که برای پوست استخوانی دامنه آن از ۱/۴۴ تا ppb ۳۸۵/۴ و درمغز از ۶۴۶/۵ تا ppb ۴۳۴۷ متغیر بودند. به طور کلی مقدار آفلاتوکسین مغز در دو باغ مورد مطالعه در ارقام اوحدی، کله قوچی و احمد آقایی به ترتیب ۱۲، ۲۵ و ۲۱ برابر مقدار آن در پوست استخوانی بود.

مقایسه پتانسیل تولید آفلاتوکسین در جدایه‌ها مشخص نمود که ۶۷ درصد جدایه‌ها تولید آفلاتوکسین های B_1 و B_2، ۲۴ درصد تولید آفلاتوکسین B_1 نمودند و ۹ درصد قادر به تولید آفلاتوکسین نبودند. همچنین هیچ یک از جدایه‌ها تولید آفلاتوکسین‌های G_1 و G_2 ننمودند. مقایسه فراوانی گونه‌های مختلف نشان داد که گونه غالب توکسین‌زا *A. flavus* بوده و گونه‌های دیگر توکسین‌زا به ندرت مشاهده گردید، که این موضوع نیازمند تحقیقات فراگیر و دامنه‌دار می‌باشد.

بحث

یکی از منابع آلودگی به گونه‌های مختلف قارچ آسپرژیلوس و آفلاتوکسین، پسته‌های ترک خورده منظم و نامنظم می‌باشند که در طی رشد و بلوغ میوه روی درخت پسته تشکیل می‌شوند. در این تحقیق نقش این پسته‌ها در باغ با اندازه‌گیری فاکتورهایی همچون فراوانی گونه‌های آسپژیلوس در میوه‌های مذکور، مقدار آفلاتوکسین و خصوصیات ظاهری آنها مورد بررسی قرار گرفت.

بر اساس نتایج به دست آمده، مقدار آلودگی به قارچ‌های مورد مطالعه و مقدار آفلاتوکسین در پسته‌های زود خندان از سالی به سال دیگر، از منطقه‌ای به منطقه‌ی دیگر و حتی از درختی به درخت دیگر متفاوت بود، که با نتایج تحقیق سایرین مطابقت دارد (Doster & Michailides, 1995). نتایج همچنین نشان داد که پسته‌های زودخندان با پوست سبز خشک و نیمه خشک کیفیت پایینی دارند و غالبا آلوده به کپک‌ها و آفات می‌باشند و میزان آفلاتوکسین نیز در آنها بالا می‌باشد که علت آن را می‌توان در معرض قرار گرفتن طولانی مدت مغز در برابر اسپورهای هوازاد گونه‌های مختلف قارچ آسپرژیلوس مولد آفلاتوکسین در باغ دانست. که حاکی از ایجاد آلودگی تحت شرایط می باشد و منجر به تولید آفلاتوکسین گردیده بود. همچنان که پسته‌های زودخندان که در فاصله زمانی دیرتری نسبت به زمان برداشت (با پوست سبز خشک و نیمه خشک) تشکیل شده بودند رنگ‌گیری بیشتر و آلودگی بالاتری به قارچ‌های گروه *A. flavus* و میزان آفلاتوکسین بالاتری نسبت به آنهایی که در زمان برداشت تشکیل شده بودند، داشتند. این موضوع نشان دهنده نقش مهم برداشت زود هنگام (بلوغ فیزیولوژیکی) به منظور کاهش سطوح آلودگی و مقدار آفلاتوکسین می‌باشد، که بوسیله محققین دیگر مورد تاکید قرار گرفته است (Moradi and Hokmabadi, 2010; Doster & Michailides, 1995; Panahi & Khezri, 2011; Doster & Michailides 1994). در این رابطه گزارش شده است که آلودگی میوه پسته به قارچ‌های مولد آفلاتوکسین از باغ شروع می‌شود (Thomson & Mehdy, 1978; Sommer and Buchanan, 1986 و مرادی و میرابوالفتحی، ۱۳۸۶) و زمانی که پوست سبز میوه پسته ترک می‌خورد و مغز آن در مجاورت هوا قرار می‌گیرد می‌تواند بوسیله میکروارگانیسم‌هایی که در فضای باغ‌ها وجود دارند، آلوده گردد و چون رطوبت مغز بین ۳۰ تا ۴۰ درصد متغیر می‌باشد و دما نیز برای آلودگی به *A. flavus* مناسب است، این قارچ می‌تواند بطور موفقیت‌آمیزی با سایر میکروارگانیسم‌ها رقابت نموده، تولید اسپور نموده و به عنوان اینوکولوم ثانویه در مراحل بعدی عمل نماید (Doster & Michailides, 1995). از موارد دیگر می‌توان به توسعه آلودگی بعد ازبرداشت اشاره نمود، که تحت تاثیر فاکتورهایی از قبیل دما و رطوبت محیط و شرایط میوه پسته در زمان فرآوری، انبارداری و حمل و نقل است (Bensass *et al*., 2010; Georgiadou *et al*., 2012; Marin *et al*., 2012; Mojtahedi *et al*., 1980).

پسته‌های زودخندان با پوست سبز خشک و نیمه خشک، آلودگی بیشتری (بین ۲ تا ۴۸ برابر بیشتر در مقایسه با پسته‌های زودخندان با پوست نرم) به گونه‌های مورد مطالعه آسپرژیلوس، شب‌پره خرنوب و مورچه داشتند که این امر باعث کاهش کیفیت این پسته‌ها گردیده بود. لازم به ذکر است که در میوه‌های بدون ترک‌خوردگی

پوست سبز هیچ‌گونه آلودگی مشاهده نگردید. شب‌پره خرنوب یکی از آفات باغی و انباری درختان پسته می‌باشد که در ابتدای فصل روی میزبان‌های اولیه زندگی می‌کند و از تیرماه همزمان با ترک‌خوردگی پوست سبز میوه پسته فعالیت خود را شروع می‌کند. این حشرات نقش مهمی در آلودگی مغز به قارچ‌ها و آفلاتوکسین از طریق فراهم آوردن مسیر ورود و یا انتقال اسپور قارچی به داخل میوه دارند (Mehrnejad & Panahi, 2006).

نتایج این تحقیق نشان داد که از خصوصیات ظاهری پوست استخوانی مخصوصا" نوع و شدت رنگ‌گیری (شکل ۱) می توان به عنوان یک معیار برای جداسازی یا غربال پسته‌های آلوده به کپک‌ها، آفات و آفلاتوکسین جهت کاهش سطح آلودگی محصول تولید شده استفاده نمود، که تعدادی از محققین به این موضوع اشاره نموده اند (مرادی و میرابوالفتحی، ۱۳۸۶؛ Sommer *et al*., 1986; Doster & Michailides, 1999; Moradi & Javanshah, 2006; Shakerardekani *et al*., 2012; Doster & Michailides, 1994). برداشت به موقع می تواند در کاهش فراوانی پسته های مرتبط با آلودگی مفید واقع گردد.

مقایسه میزان آفلاتوکسین در اجزاء مختلف میوه پسته نشان داد که بیشترین آلودگی مربوط به مغز می‌باشد. با توجه به اینکه درصد وزن مغز و پوست استخوانی از جمع کل (به ترتیب در رقم کله قوچی ۵۳ و ۴۷، در رقم اوحدی ۴۸ و ۵۲، در رقم احمد آقایی۵۰ و۵۰) در پسته‌های زود خندان در ارقام مورد بررسی تقریبا برابر بودند و مقدار آفلاتوکسین‌ها در پوست استخوانی و مغز به ترتیب حدود ۵ و ۹۵ درصد از مقدار کل آفلاتوکسین‌ها بود. بنابراین چنانچه برای اندازه گیری آفلاتوکسین در پسته‌های آلوده همچون زودخندان خشک و نیمه خشک، از پوست استخوانی و مغز استفاده گردد، این امر سبب تخمین کمتر غلظت واقعی آفلاتوکسین‌ها در مغز می‌گردد. در این رابطه، شالتن و اسپانجر (۱۹۹۶) گزارش نمودند که می توان وزن پوست استخوانی از کل پسته را ۴۲/۸٪ فرض نمود و با توجه به اینکه مقدار آفلاتوکسین B_1 در پوست استخوانی بیشتر از ppb ۲ در آلودگی های بالا نمی باشد بنابراین مقدار آفلاتوکسین در مغز را می توان زمانی که هر دو پوست استخوانی و مغز با هم آنالیز می‌شوند، تخمین زد (Scholten & Spanjer, 1996).

نتیجه‌گیری

نتایج اندازه گیری آفلاتوکسین در جدایه‌های مختلف بیانگر تفاوت‌های کمی در مقدار تولید آفلاتوکسین‌ها و همچنین نوع آنها بود. تعدادی از جدایه‌های *A. flavus* قادر به تولید آفلاتوکسین‌ها نبودند که این موضوع نیاز به بررسی بیشتر مناطق پسته کاری دارد و همچنین تحقیق روی برهمکنش بین استرین‌های توکسین‌زا و غیر توکسین‌زا و پایداری غیرتوکسین‌زایی جهت مدیریت جمعیت گونه‌های توکسین‌زا در باغ‌های پسته مفید می‌باشد.

منابع

مرادی، م. و میرابوالفتحی، م. (۱۳۸۶). تغییرات جمعیتی گونه‌های *Aspergillus* در ترمینال‌های فراوری پسته. مجله علمی و پژوهشی پژوهش و سازندگی، شماره ۷۷، ۱۰۵-۱۱۰.

Amaike, S. & Keller, N. P. (2011). "*Aspergillus flavus*." Annu Rev Phytopathol; 49: 107-133.

Bensass, F., Rhouma, A., Ghrab, M., Bacha, H. & Rabeh Hajlaoui, M. (2010). Evaluation of cultivar susceptibility and storage periods towards aflatoxin B1 contamination on pistachio nuts. Mycotoxin Research; 26:199–203.

Doster, M. A. & Michailides, T. J. (1993). Influence of cultural practices on occurrence of early split pistachio nuts. PP: 82-84, in: California Pistachio Industry, Annual Report Crop Year. 1992-1993, California Pistachio Commission, Fersno.

Doster, M. A. & Michailides, T. J. (1994). *Aspergillus* molds and aflatoxin in pistachio nuts in California. Phytopathology, 84: 583-590.

Doster, M. A. & Michailides, T. J. (1995). The relationship between date of hull splitting and decay of pistachio nuts by *Aspergillus* species. Plant Dis. 766-769.

Doster, M. A. & Michailides, T. J. (1999). Relationship between shell

discoloration of pistachio nuts and incidence of fungal decay and insect. Plant Dis. 83: 259-264.

Georgiadou, M., Dimou, A. & Yanniotis, S. (2012). Aflatoxin contamination in pistachio nuts: A farm to storage study. Food Control; 26 (2):580-586.

Klich, M. A., (2002). Identification of common *Aspergillus* species. Central voor Schimmelcultures, Utrech, The Netherland; pp 116.

Marín, S., Ramos, A. J. & Sanchis, V. (2012). Modelling *Aspergillus flavus* growth and aflatoxins production in pistachio nuts. Food Microbiology, 32:378-388.

Mehrnejad, M. R. & Panahi, B. (2006). The influence of hull cracking on aflatoxin contamination and insect infestation in pistachio nuts. In: Applied Entomology and Phytopathology; 73(2), p. 39-42.

Mojtahedi, H., Danesh, D., Haghighi, B. & Fathy, S. (1980). Storage relative humidity in Rafsanjan and impossibility of pistachio aflatoxicosis after nut processing. Iranian Journal Plant Pathology; 16:80-85.

Moradi, M. & Javanshah, A. (2006). Distribution of aflatoxin in processed pistachio nut terminals. Acta Horticulture, (ISHS); (726):431-436.

Moradi, M. & Hokmabadi, H. (2011). Control of Mycotoxin Bioactives in Nuts: Farm to Fork. In Tokusoglu, Ö (ed), Fruit and Cereal Bioactives Sources, Chemistry, and Applications; (pp. 253-273) CRC Press.

Moradi, M., Hokmabadi, H. & Mirabolfathy, M. (2010). Incidence of *Aspergillus* Species Airborne Spores in Pistachio Growing Regions of Iran. International Journal of Nuts and Related Sciences; (1):54-64.

Panahi, B. & Khezri, M. (2011). Effect of harvesting time on nut quality of pistachio (Pistacia vera L.) cultivars. Scientia Horticulturae; 129, 730–734.

Richard, J. L. & Payne, G. A. (2003). Mycotoxins in plant, animal, and human systems. Task Force Report No. 139. Council for Agricultural Science and Technology.

Scholten, J. M. & Spanjer, M. C. (1996). Determination of aflatoxin in pistachio and shells, J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.; 79:1360-1364.

Shakerardekani, A., Karim, R. & Mirdamadiha, F. (2012). The effect of sorting on aflatoxin reduction of pistachio nuts. Journal of Food Agriculture and Environment; 10 (1): 459-461.

Sommer, N. F., Buchanan, J. R. & Fortlage, R. J. (1986). Relation of early splitting and tattering of pistachio nut to aflatoxin in orchard. Phytopathology ; 76: 692-694.

Thomson, S. V. & Mehdy, M. C. (1978). Occurrence of *Aspergillus flavus* in pistachio nuts prior to harvest. Phytopathology; 68: 1112-1114.

Trucksess, M. W. (2000). Natural toxins. In official methods of analysis of AOAC international. Horwitz, W. (Ed.), 17th ed. Chapter 49, p. 1-64, Gaithersburg, Maryland, 2000; 20877-2417 USA.

Wei, D. L. & Jong, S. C. (1986). Production of aflatoxins by strains of *Aspergillus flavus* group maintained in ATCC. Mycopathologia; 93: 19-24.