Archive of SID

Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 12, Number 1 (March - April)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Identification of *aflR* Gene in Aflatoxigenic *Aspergillus* Isolated from Pistachio Kernel of Sirjan Region Using Molecular Method

Zahra Salehi[1], Babak Kheirkhah[2], Zahra Masoumalinejad [1], Mohammad Reza Zinatizadeh[3]

1. Department of Microbiology, Sirjan Branch, Islamic Azad University, Sirjan, Iran
2. Department of Microbiology, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran
3. Department of Genetics, Faculty of Science, Tonekabon Branch of Islamic Azad University, Mazandaran, Iran

Downloaded from ijmm.ir at 12:09 +0430 on Saturday September 8th 2018

Article Information

Article history:
Received: 2017/06/17
Accepted: 2018/01/23
Available online: 2018/05/14

Article Subject: Mycology

IJMM 2018; 12(1): 43-50

Corresponding author:

Babak Kheirkhah
Assistant Professor, Department of Microbiology, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran

Tel: 09133454787

Email:
babakkheirkhah@yahoo.com

Use your device to scan and read the article online

Abstract

Background and Aims: Aflatoxins are a large group of mycotoxins and secondary metabolites of *Aspergillus* fungal species. *aflR* The interfering genes group in the transcription and production of aflatoxin plays an important role in *Aspergillus* fungi. In this study, the molecular identity of aflatoxigenic Aspergillus spp. in fresh pistachios in Sirjan city was investigated.

Materials and Methods: In This study 100 samples of fungal infected pistachio were purposefully collected from pistachio warehouses in Sirjan city. Samples were transferred to the sabouraud dextrose broth medium. The positive control used in this study were generator genes of aflatoxin in *Aspergillus* strains and negative control were non *Aspergillus* fungal strains and non aflatoxic *Aspergillus*. DNA extraction were performed by kit and PCR method was used for identification of AflR gene in samples of fungal infected pistachio warehouses for confirmation of the presence of the generator genes of aflatoxin.

Results: Molecular results showed that among 100 samples of fresh pistachio nuts that were purposefully selected, there were 10 healthy samples, and in 64 *Aspergillus fungi* ones, 18 samples contained *pencillium*, 1 sample *mucor*, 5 sample *Saprophytic* and 2 samples contained unknown fungal infection. Among *Aspergillus*, only in 7 cases were regulatory gene of aflatoxin.

Conclusions: By studying this subject, factors affecting on ways to reduce aflatoxin can be found. Since most countries are sensitive on the issue of aflatoxin in terms of health, this research can play an important role in the ways of increasing exports to countries.

Keywords: *Aspergillus*, Aflatoxin , Polymerase Chain Reaction

Copyright © 2018 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

Salehi Z, Kheirkhah B, Masoumalinejad Z, Zinatizadeh M R. Identification of *aflR* Gene in Aflatoxigenic *Aspergillus* Isolated from Pistachio Kernel of Sirjan Region Using Molecular Method. Iran J Med Microbiol. 2018; 12 (1): 43-50

How to cite this article:

www.SID.ir

Archive of SID

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۲ – شماره ۱ – فروردین-اردیبهشت ۱۳۹۷

Journal homepage: www.ijmm.ir

Downloaded from ijmm.ir at 12:09 +0430 on Saturday September 8th 2018

شناسایی ژن *aflR* در قارچ *آسپرژیلوس* مولد افلاتوکسین جداشده از مغز پسته در منطقهٔ سیرجان با استفاده از روش PCR در سال ۱۳۹۵

زهرا صالحی[۱]، بابک خیرخواه[۲]، زهرا معصومعلی نژاد[۱]، محمدرضا زینتی‌زاده[۳]

۱. گروه میکروبیولوژی، واحد سیرجان، دانشگاه آزاد اسلامی، سیرجان، ایران
۲. گروه میکروب‌شناسی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران
۳. گروه ژنتیک، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، مازندران، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله
دریافت: ۱۳۹۶/۰۳/۲۷
پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۰۳
انتشار آنلاین: ۱۳۹۷/۰۲/۲۴
موضوع: قارچ شناسی

IJMM1397;12(1): 43-50

نویسنده مسئول:
بابک خیرخواه
استادیار، گروه میکروب‌شناسی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران
تلفن: ۰۹۱۳۳۴۵۴۷۸۷

پست الکترونیک:
babakkheirkhah@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: افلاتوکسین‌ها گروه بزرگی از مایکوتوکسین‌ها و متابولیت‌های ثانویه از گونه‌های قارچ *آسپرژیلوس* هستند. *aflR* گروهی از ژن‌های مداخله‌کننده در نسخه‌برداری و تولید آفلاتوکسین در قارچ‌های *آسپرژیلوس* هستند. در این مطالعه هویت مولکولی قارچ *آسپرژیلوس* مولد سم افلاتوکسین در پسته‌های تازهٔ شهرستان سیرجان بررسی شد.

مواد و روش‌کار: تعداد ۱۰۰ نمونه پستهٔ آلوده به قارچ از انبارهای پسته در شهرستان سیرجان به روش هدفمند اخذ شد. نمونه‌ها به محیط کشت سابورو دکستروز براث منتقل شدند. کنترل مثبت استفاده‌شده در این پژوهش، سویه قارچ *آسپرژیلوس* مولد سم افلاتوکسین و کنترل منفی سوش‌قارچی غیر *آسپرژیلوس* و *آسپرژیلوس*‌های غیر آفلاتوکسیک بودند. استخراج DNA با استفاده از کیت و از PCR برای شناسایی ژن *aflR* در نمونه‌های آلوده به قارچ انبارهای پسته استفاده شد.

یافته‌ها: از بین ۱۰۰ نمونه مغز پستهٔ تازه که به‌صورت هدفمند انتخاب شده بودند، ۱۰ نمونه‌مورد سالم ۶۴ نمونه آلوده به قارچ‌های *آسپرژیلوس*، ۱۸ نمونه آلوده به قارچ *پنیسلیوم*، ۱ مورد موکور، ۵ نمونه ساپروفیت و ۲ مورد آلودگی قارچی ناشناخته گزارش شد. از بین *آسپرژیلوس*‌ها فقط در ۷ مورد ژن تنظیمی مولد افلاتوکسین حضور داشت.

نتیجه‌گیری: در بسیاری از کشورها آلودگی پسته به آفلاتوکسین به مقادیر مختلف وجود دارد، که می تواند تهدید کننده ی سلامت جامعه باشد. . بهترین اقدام برای جلوگیری از پیامدها و کاهش آفلاتوکسین در پسته، نظارت و کنترل بر تولید، نگهداری و توزیع آن ها و تشخیص آلودگی توسط تکنیک های دقیق مولکولی است. هم چنین ایجاد شرایط ایده آل برای به حداقل رساندن آلودگی امری لازم برای سلامت مصرف کنندگان است.

کلمات کلیدی: *آسپرژیلوس، آفلاتوکسین، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز*

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

پسته یکی از مهم‌ترین محصولات کشاورزی و باغی ایران است و استان کرمان بیشترین سطح زیر کشت تولید پسته در کشور را دارد (۱). برطبق آمار سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد(فائو)، ایران بزرگ‌ترین تولیدکنندهٔ پسته در دنیا است (۲). این محصول مقام دوم صادرات غیر نفتی کشور را بعد از فرش به خود اختصاص داده است. به‌همین دلیل پستهٔ ایران در بین محصولات صادراتی و ارزآور کشور اهمیت خاصی داشته که باید برای حفظ و ارتقاء موقعیت جهانی آن تلاش بیشتری انجام داد (۳). آلودگی پسته به گونه‌های قارچ *آسپرژیلوس* و مایکوتوکسین-های آن، مهم‌ترین معضل در زمینهٔ مصرف و صادرات این محصول محسوب می‌شود (۴).

آفلاتوکسین‌ها گروهی از مایکوتوکسین‌ها و متابولیسم‌های ثانویه با اثرات سمی، سرطان‌زایی و جهش‌زایی هستند که به‌طور عمده از گونه‌های *آسپرژیلوس* (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus nomius*, *Aspergillus ochraceoroseus*) تولید می‌شوند. علاوه‌براین بیش از ۵۰ گونهٔ

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijmm.ir at 12:09 +0430 on Saturday September 8th 2018

دیگر از قارچهای رشته‌ای شامل چندین گونه از *Penicillium* و *Choetominum* نیز آفلاتوکسین تولید می‌کنند (۵،۶). توکسین‌ها به‌عنوان عوامل زیستی شناخته شده‌اند که در مقادیر بسیار کم می‌توانند برای موجودات زنده ازجمله انسان‌ها و حیوانات خطرناک و اغلب کشنده باشند و از دست دادن زمان می‌تواند صدمات جبران‌ناپذیری وارد کند (۷). افلاتوکسین‌ها اثرات استروژنی روی انسان و حیوان دارند (۸،۹).

آلودگی میوه‌های پسته به قارچهای تولیدکنندهٔ این توکسین، از باغ‌ها شروع شده و پس از برداشت درهنگام درجه-بندی پسته‌ها با آب، میزان آلودگی به اسپور قارچهای مزبور به‌طور چشمگیری افزایش می‌یابد (۱۰). شناسایی و تشخیص بیوشیمیایی آنزیم‌های دخیل در چرخهٔ متابولیکی بیوسنتز آفلاتوکسین به جداسازی ژن‌های مسئول در تولید این آنزیم‌ها وابسته است (۱۱). تعداد ۲۵ ژنی که در بیوسنتز آفلاتوکسین شرکت دارند، در ناحیهٔ ۷۵ کیلو بازی از DNA بر روی کروموزوم گروه‌بندی شده‌اند (۶). نقش ژن *aflR* (ژن محافظت‌شده) در تنظیم تولید آفلاتوکسین به اثبات رسیده است (۱۲). این ژن اختصاصی تنظیم‌کنندهٔ مثبت مسیر تولید آفلاتوکسین، سبب فعال شدن رونویسی اکثر ژن‌ها می‌شود. اضافه کردن یک نسخهٔ دیگر از این ژن سبب تولید مضاعف مواد حد واسط در بیوسنتز آفلاتوکسین می‌شود (۱۳). رونویسی ژن‌های مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین با اتصال پروتئین AFLR به توالی پالیندرومیک در ناحیهٔ پروموتور ژن‌های ساختمانی در *A.flavus* فعال می‌شود (۶). علاوه‌براین، ژن‌های دیگری(*aflT moxY cypA, cypX,* و *ordB*) نیز در مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین یافت شده‌اند: *aflT* که یک پروتئین متصل‌شونده به غشاء را کد می‌کند و به نظر می‌رسد در ترشح آفلاتوکسین مؤثر باشد (۱۲)؛ عملکرد ژن‌های *moxY cypA, cypX,* و *ordB* هنوز ناشناخته است (۱۳،۱۵).

به‌منظور ارزیابی کیفیت مواد غذایی و نیز بررسی حضور مایکوتوکسین‌ها، شناسایی قارچهای توکسین‌زا امری ضروری است (۱۶). روش‌های مرسوم برای تشخیص قارچها در مواد غذایی براساس روش‌های مبتنی بر کشت و مطالعات میکروسکوپی، نیازمند کار آزمایشگاهی فشرده بوده و بسیار وقت‌گیر هستند (۱۷، ۱۸). اخیراً روش‌های مولکولی مثل واکنش زنجیرهای پلیمراز (PCR) به‌دلیل حساسیت بالا، اختصاصی و سریع بودن، تبدیل به یک ابزار مقتدر برای تشخیص قارچهای توکسین‌زا شده اند (۱۹،۲۰).

آموزش مردم از خطر رژیم غذایی آلودگی افلاتوکسین، برداشت زودهنگام، خشک‌کردن، بهداشت محیط، بهبود ساختار ذخیره‌سازی و کنترل بیولوژیکی باید انجام شود. همچنین در یکی از تحقیقات به‌عمل‌آمده، به‌نظر می‌رسد کمبود پروتئین، ظرفیت کبد را برای سم‌زدایی افلاتوکسین کاهش می‌دهد (۲۱).

با توجه به اهمیت اقتصادی و بهداشتی آفلاتوکسین‌ها، هدف از انجام این تحقیق شناسایی ژن *aflR* در قارچ *آسپرژیلوس* مولد افلاتوکسین جداشده از مغز پسته در منطقهٔ سیرجان در سال ۱۳۹۵ با استفاده از روش مولکولی است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و جامعهٔ مطالعه‌شده

در این مطالعهٔ مقطعی در سال ۱۳۹۵ برای تهیه و جمع‌آوری نمونه‌های آلوده به قارچ در انبارهای پسته شهرستان سیرجان به طور تصادفی ، تعداد ۱۰۰ نمونه اخذ شد. مغز پسته‌ها در ظروف استریلِ از قبل تهیه‌شده قرار گرفتند و در دمای ۴ °C به آزمایشگاه انتقال یافتند.

در آزمایشگاه نمونه‌ها به محیط کشت سابروز دکستروز براث منتقل شدند، که محیطی غنی و عمومی برای رشد اکثر قارچها است. با افزودن کلرامفنیکل به این محیط، رشد باکتری‌ها در آن متوقف شد. نمونه‌ها به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸-۳۰ °C گرم-خانه‌گذاری شدند.

آزمایش قارچ‌شناسی

نمونه‌ها را به‌خوبی در محیط سابروز دکستروز براث شیک کرده و سپس مقداری از آن روی محیط رز بنگال آگار(Merck Co. Germany) ریخته شد و در انکوباتور تحت حرارت، رطوبت و تاریکی قرار گرفت. مدت زمان نگهداری ۷ تا ۱۰ روز در نظر گرفته شد.

جداسازی و خالص‌سازی قارچها

جداسازی ایزوله‌های قارچی با استفاده از محیط کشت PDA (Merck Co. Germany) صورت گرفت. به‌منظور خالص‌سازی ایزوله‌های قارچی از روش سینگل اسپور استفاده شد. بدین‌صورت-که با آنس سوزنی ظریف میزان کمی از اسپور قارچی به لولهٔ محتوی آب مقطر استریل منتقل و سپس به‌وسیلهٔ لام توما رقت آن محاسبه شد. پس از تهیهٔ رقتی مناسب، قطره‌ای از سوسپانسیون حاصل به محیط کشت واتر آگار (Merck Co. Germany) انتقال یافت. پس از گذشت ۱۲ الی ۲۵ ساعت، از کلنی رشدیافته بر روی محیط واتر آگار، به محیط کشت PDA که قبلا در پلیت استریل ریخته و سرد شده بود، در ۳ نقطه منتقل

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijmm.ir at 12:09 +0430 on Saturday September 8th 2018

شده و به‌مدت ۴ روز در دمای ۲۴°C گرم‌خانه‌گذاری شد. درنهایت براساس خصوصیات میکروسکوپی و ماکروسکوپی گونه‌های آسپرژیلوس شناسایی شدند.

رسوب‌گیری و استخراج DNA

نمونه کاملاً در سرم فیزیولوژی مخلوط شد تا اسپورها و تکه‌های میسیلیوم به‌خوبی در سرتاسر محیط پخش شوند. سپس حدود ۱ ML از نمونه به میکروتیوپ ۱/۵ ML منتقل و به‌مدت ۱۵ دقیقه در دور ۵۰۰۰rpm سانتریفوژ شد. سپس محلول رویی تخلیه شده، حدود ۱۰۰ µL رسوب در ته لوله باقی ماند و مراحل استخراج DNA روی رسوب انجام گرفت (۲۲). استخراج DNA با استفاده از کیت (شرکت سیناژن) انجام شد. کنترل مثبت استفاده‌شده در این پژوهش، سویهٔ قارچ *آسپرژیلوس* مولد سم افلاتوکسین(IR6)5006 PTCC) بود که از دانشکدهٔ بهداشت دانشگاه تهران اخذ شد.

PCR

به‌منظور شناسایی ژن *aflR* در نمونه‌های آلوده به قارچ در انبارهای پسته از روش PCR استفاده شد. در این روش با استفاده از کیت Mastermix (سیناژن، ایران) تهیه و PCR انجام شد. توالی پرایمرهای استفاده‌شده در جدول ۱ ذکر شده است (۲۲). برای انجام PCR در حجم نهایی ۲۵µL، ۱۲/۵ µL مسترمیکس، ۲ µL از DNA باکتری (با غلظت ۱/۹ نانوگرم) ، ۱ µL از پرایمرها (۱۰۰pmol) و ۸/۵ µL آب مقطر استریل به‌کار رفت. همچنین در جدول ۲ واکنش PCR طبق برنامهٔ مربوطه انجام شد.

آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از تست آماری ANOVA با نرم‌افزار SPSS ورژن ۱۸ انجام گرفت.

جدول ۱. توالی‌های نوکلئوتیدی و آغازگر استفاده‌شده در تشخیص *آسپرژیلوس* مولد سم (۲۲)

Fungus	Target	Sequence 5′ to 3	product size
Aspergillus	aflR	F: 5′-TATCTCCCCCCGGGCATCTCCCGG-3′ R: 5′- GTCGGCGCCACGCACTGGGTTGGGG -3′	1032 bp

جدول ۲. برنامهٔ درجهٔ حرارت و زمان برای PCR

cycles	period of time	Temperatures	Stage name
۱	۱۰ min	۹۴ ºC	**First Denaturation**
۳۵	۱ min	۹۴ ºC	**Second Denaturation**
	۲min	۶۵ ºC	**Primer Annealing**
	۲min	۷۲ ºC	**First Extension**
۱	۵ min	۷۲ ºC	**Final Extension**

یافته‌ها

از ۱۰۰ نمونه پسته‌هایی که از لحاظ خواص ظاهری، سیاهی و لکه‌دار شدن مغز مشکوک به آلودگی قارچی بودند، پس از کشت روی محیط و مشاهدهٔ کلنی‌ها و خواص میکروسکوپی، ۹۰ مورد آلوده (۹۰٪) و ۱۰ مورد (۱۰٪) فاقد آلودگی بودند. براساس روش ذکر شده در فصل مواد و روش‌ها، کلنی‌های *آسپرژیلوس* به شکل سفیدرنگ، برجسته و ابری‌شکل در محیط رزبنگال مشاهده شدند.

در شکل ۱ کلنی‌های انبوه *آسپرژیلوس* را در محیط مذکور نشان می‌دهد. پس از این از کلنی‌های رشدکرده در محیط اول هاگ‌ها برداشته شده و در محیط دوم به‌صورت خطی کشت داده شدند تا خالص‌سازی کلنی‌ها به‌طور کامل انجام شود.

در شکل ۲ کلنی‌های رشدکردهٔ در محیط رزبنگال کلنی‌های برجستهٔ سفید، ابری و با مشاهدهٔ میکروسکوپی هیچ‌گونه کلنی دیگری که مشکوک به رشد سایر قارچها باشد، مشاهده نشد. درصورتی‌که کلنی مشکوکی دال بر رشد قارچ دیگری به‌چشم می‌خورد، آن پلیت حذف می‌شد.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijmm.ir at 12:09 +0430 on Saturday September 8th 2018

شکل ۱. رشد کلنی‌های *آسپرژیلوس* در محیط رزبنگال آگار

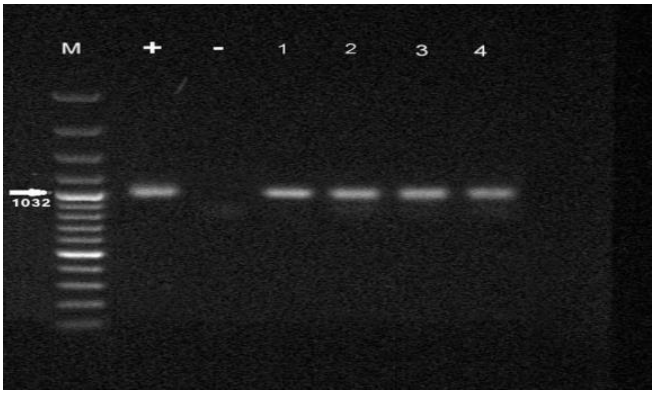
شکل۲. رشد کلنی‌های *آسپرژیلوس* در محیط مجدد رزبنگال آگار

در کشت اول که روی محیط رزبنگال صورت گرفت، قارچ-های دیگری غیر از *آسپرژیلوس* مشاهده شدند. از ۱۰۰ نمونه پسته‌ای که آزمایش شدند، ۹۰ مورد آلوده به قارچ‌های دیگری مثل *آسپرژیلوس، موکور، پنی‌سلیوم* و قارچ‌های *ساپروفیت* بودند. بنابراین، از ۹۰ نمونهٔ آلوده، ۶۴ نمونه *آسپرژیلوس*، ۱۸ مورد *پنیسلیوم*، ۳ مورد قارچ *موکور*، ۵ مورد *ساپروفیت* و ۱۰ مورد آلودگی قارچی ناشناخته بود.

نتایج مولکولی

پرایمری که در این مطالعه برای بررسی ژن مولد افلاتوکسین استفاده شد(جدول ۱)، با توالی فوروارد و ریورس تکثیر کننده ژن تنظیم کننده سنتز افلاتوکسین (aflr) بود (۲۲). از ۶۴ نمونهٔ آسپرژیلوس بدست آمده از پسته، ۷ نمونه واجد ژن مولد افلاتوکسین و ۵۷ نمونه فاقد این ژن بودند (جدول ۳).

از کل ۱۰۰ نمونهٔ آزمایش شده، ۷٪ از نمونه‌ها واجد ژن مولد افلاتوکسین بوده و از میان کل نمونه‌های آلوده به قارچ *آسپرژیلوس* فقط ۱۰/۹۳٪ ژن مولد افلاتوکسین داشتند.



شکل ۳. تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR با استفاده از آغازگر *aflR*

بحث

با توجه به اینکه فرآیند آلودگی به قارچ *آسپرژیلوس* و افلاتوکسین از پیچیدگی بسیار زیادی برخوردار است، به‌گونه‌ای‌که در بسیاری از موارد نابودسازی یا حتی کنترل آلودگی به توکسین، اتخاذ چندین رویکرد و روش مختلف را طلب می‌کند؛ لذا انجام فعالیت‌های تحقیقاتی درخصوص شناسایی ارقام مقاوم محصولات مختلف به قارچ *آسپرژیلوس* و افلاتوکسین و همچنین مطالعه در زمینهٔ تأثیرات فیزیکوشیمیایی پوستهٔ مغز پسته در جلوگیری از رشد قارچ و تولید توکسین می‌تواند مبنای مناسبی برای کنترل آلودگی آفلاتوکسین فراهم کند.

به‌این‌منظور در اکثر نقاط جهان تحقیقات گسترده و وسیعی برای شناسایی ارقام مقاوم محصولات زراعی و باغی، به قارچ *آسپرژیلوس* و آفلاتوکسین و بررسی مکانیسم‌های مقاومت آنها درحال انجام است، که نتایج موفقیت‌آمیزی نیز از آن‌ها گزارش می‌شود (۲۳).

مغز پستهٔ تازه به‌عنوان یکی از مهم‌ترین خشکبار جهان، معروف به طلای سبز، در صنعت مواد غذایی و در صنعت لوازم آرایشی به‌کار می‌رود و از لحاظ صادرات جزء بزرگ‌ترین صادرات غیر نفتی در جهان است. در این مطالعه، مغز پستهٔ شهرستان سیرجان که منبع اصلی تولید این محصول در جهان محسوب می-شود، از نظر آلودگی قارچی و حضور ژن تنظیم کننده تولید افلاتوکسین بررسی شد.

افلاتوکسین‌ها گروه بزرگی از مایکوتوکسین‌ها را تشکیل می‌دهند. متابولیت‌های ثانویه با اثرات سمی، سرطان‌زایی و جهش‌زایی هستند که به‌طور عمده ازسوی گونه‌های *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* تولید می‌شوند (۲۴). عوامل

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijmm.ir at 12:09 +0430 on Saturday September 8th 2018

محیطی مختلف مثل درجهٔ حرارت و رطوبت نسبی مهم‌ترین فاکتورهای مؤثر در تولید آفلاتوکسین هستند. تولید بهینهٔ آفلاتوکسین در دامنهٔ دمایی ۳۵°C -۲۸ است (۲۵). مطالعات انجام‌شده نشان داده‌اند که درجهٔ حرارت و رطوبت نسبی بهینه برای تولید افلاتوکسین در پسته و فندق ۳۰-۲۵°C و ۹۹-۹۷٪ است (۲۶،۲۷).

در مطالعه‌ای که Mojtahedi و همکاران بر روی پستهٔ ایران انجام دادند، فلور قارچ اصلی روی میوهٔ پسته *آسپرژیلوس* معرفی شد. در این تحقیق، ۱۳ گونه *آسپرژیلوس* از میوه‌های پسته گزارش شدند که گونهٔ غالب *A. niger* گزارش شد (۲۸). در مطالعه حاضر به بررسی گونه آسپرژیلوس پرداخته نشده و هدف شناسایی ژن *aflR* در قارچ آسپرژیلوس مولد افلاتوکسین بوده است ولی می توان در تحقیقات بعدی به بررسی گونه غالب نیز پرداخته شود.

Rahimi و همکاران نیز بیش از ۲۳۰ جدایهٔ قارچی از میوه-های پستهٔ باغ‌های اصفهان، کرمان و رفسنجان، انبارها و همچنین نخاله‌های پستهٔ ریخته شده در باغ‌های مختلف به‌دست آوردند که براساس مطالعات مورفولوژیکی، ۱۷۰ جدایه متعلق به گونه‌های مختلف *آسپرژیلوس* بودند، که ازاین‌نظر با یافتهٔ این آزمایش همسویی دارد. در میان *آسپرژیلوس*‌های جمع‌آوری شده از باغ‌های پسته، *A.niger* بیشترین فراوانی را داشت و پس از آن *A.flavus* ، *A.terreus* و *A.ochraceus* قرار داشتند (۲۹).

در مطالعه Mimoune و همکاران فراوان‌ترین قارچ‌های جداشده از نمونه‌های پسته و همچنین در بادام و کنجد به‌ترتیب *آسپرژیلوس* با ۸۴/۶۹٪ و پنی‌سلیوم با ۹/۳٪ و موکور با ۴/۴۸٪ بوده که آسپرژیلوس رایج‌ترین جنس قارچ است و ازاین‌نظر با نتایج تحقیق حاضر همسویی دارد (۳۰). این نتایج نشان می‌دهند که *آسپرژیلوس* تولیدکنندهٔ آفلاتوکسین است و بیشتر به‌عنوان قارچ-های انباری محسوب می‌شود و در شرایطی که رطوبت و درجهٔ حرارت بالا هستند، تکثیر پیدا می‌کند. به‌طورکلی تولید آفلاتوکسین ازسوی فاکتورهای مختلفی مثل ویژگی‌های ژنتیکی قارچ‌های مولد و محیط فیزیکوشیمیایی که در آن رشد می‌کنند، تحت‌تأثیر قرار می‌گیرد.

در تحقیقی که ازسوی Najafi و همکاران روی نمونه‌های پسته صورت گرفت، با استفاده از ژن تنظیمی مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین (*aflR*)، PCR اختصاصی به‌منظور شناسایی جدایه‌های توکسین‌زا به کمک دو آغازگر 1. *aflR* و 2. *aflR* انجام شد، که درتمامی جدایه‌های جداسازی شده از پسته یک باند DNA درحدود ۷۹۸ جفت باز به چشم خورد (۳۱). با توجه به اینکه در مطالعه حاضر از پرایمر های دیگری برای تشخیص جدایه های توکسین زا استفاده شده است اما نتایج از لحاظ وجود جدایه های توکسین زا در نمونه های پسته مشابه می باشد.

همچنین در مطالعهٔ دیگری Rahimi و همکاران به‌منظور بررسی و شناسایی جدایه‌های *آسپرژیلوس فلاووس* و *پارازیتیکوس* موجود در نمونه‌های پسته از دو جفت آغازگر اختصاصی ژن‌های تنظیمی *aflR* و *aflJ* استفاده کردند که در تمامی جدایه‌های *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* و ۳۳ جدایهٔ *آسپرژیلوس فلاووس* جداسازی شده از پسته، با استفاده از جفت آغازگر *aflR*، یک باند DNA درحدود ۶۲۹ جفت باز مشاهده شد؛ درحالی‌که جفت آغازگر اختصاصی *aflJ* فقط در ۳۹ جدایهٔ *آسپرژیلوس فلاووس*، یک قطعه ۸۴۰ جفت بازی را تکثیر کرد. از میان جدایه‌های *آسپرژیلوس فلاووس* بررسی‌شده، ۱۹ جدایه با هر دو آغازگر *aflR* و *aflJ* نتایج مثبتی را نشان دادند (۳۲). این نتایج نشان می‌دهند که PCR روش سریع با حساسیت بالاست که در مطالعهٔ حاضر نیز از این روش مولکولی استفاده شده است.

Pourebrahim و همکاران حضور قارچ‌های مولد آفلاتوکسین در پستهٔ منطقه خراسان را با استفاده از روش مولکولی بررسی کردند. در این تحقیق، ۳۰ جدایهٔ قارچی متعلق به جنس *آسپرژیلوس* شناسایی و به کمک روش‌های مبتنی بر کشت خالص‌سازی شدند. شناسایی جنس *آسپرژیلوس* با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ازسوی جفت آغازگرهای اختصاصی انجام شد. از ۳۰ جدایه‌های قارچی فقط ۱۲ نمونه حاوی ژن *omtA* و ۴ نمونه ژن *ver1* بودند. در هیچ‌یک از جدایه‌های قارچی ژن تنظیمی *aflR* مشاهده نشد. نتایج به‌دست آمده در مقایسه با مطالعه حاضر نشان داد که هرچند بعضی از جدایه‌ها یک یا دو ژن ساختاری دخیل در مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین را دارند، ولی با توجه به حاضر نبودن ژن تنظیمی *aflR* به‌صورت بالقوه قادر به تولید آفلاتوکسین نیستند (۳۳).

Panjehkeh و همکاران ۲۲ نمونه *آسپرژیلوس* را از پسته‌های آلوده به قارچ جدا کردند. همچنین برای ژن *aflR* پرایمرهای خاص طراحی شد و باند ۷۹۸ جفت باز از هر ایزوله در تقویت DNA دلالت بر وجود ژن تنظیمی افلاتوکسین دارد. بنابراین فقط از ژن تنظیمی *aflR* برای شناسایی *آسپرژیلوس*‌های مولد افلاتوکسیژنیک استفاده شد که ازاین‌نظر با تحقیق ما همسویی دارد (۳۴).

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijmm.ir at 12:09 +0430 on Saturday September 8th 2018

طی مراحل انجام این تحقیق نیز به ارزیابی مولکولی قارچ *آسپرژیلوس* مولد سم افلاتوکسین در پسته‌های تازهٔ شهرستان سیرجان پرداخته شد. نتایج حاصل از انجام آزمایش نشان داد که از بین ۱۰۰ نمونه‌ای که به‌صورت هدفمند انتخاب شدند، ۶۴ مورد *آسپرژیلوس*، ۱۸ نمونه *پنی‌سلیوم*، ۱ مورد *موکور*، ۵ مورد *قارچ ساپروفیت* مشاهده شد و در ۱۰ نمونه هیچ‌گونه آلودگی قارچی دیده نشد. بنابراین قضاوت فقط از روی ظاهر نمونه‌ها، تشخیص دقیقی برای نشان دادن آلودگی قارچی نیست و نیاز به روش‌های کشت و مولکولی است. ازآنجایی‌که اکثر کشورها بر روی مسئلهٔ افلاتوکسین ازنظر بهداشتی حساس هستند، این تحقیق می‌تواند نقش مؤثری در راه‌های افزایش صادرات به کشورها داشته باشد.

سپاسگزاری

این مقاله قسمتی از پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشد میکروبیولوژی است که در تاریخ ۱۳۹۶/۳/۵ در دانشگاه آزاد اسلامی سیرجان به تصویب رسیده است. نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند که از همکاران و پرسنل محترم بخش میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سیرجان و همچنین خانم زهرا معصومعلی‌نژاد تقدیر و تشکر کنند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Panahi B, Khezri M. Effect of harvesting time on nut quality of pistachio (Pistacia vera L.) cultivars. Sci Hortic. 2011;129(4):730-4. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.05.029
2. Cheraghali A, Yazdanpanah H, Doraki N, Abouhossain G, Hassibi M, Ali-Abadi S, et al. Incidence of aflatoxins in Iran pistachio nuts. Food Chem Toxicol. 2007;45(5):812-6. https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.10.026 PMid:17161513
3. Sedaghat R. Constraints in production and marketing of iran's pistachio and the policies concerned: An application of the garret ranking technique. IJNRS. 2011;2(1):27-30.
4. Kabirian HR, Afshari H, Mohammadi Moghadam M, Hokmabadi H. Evaluation of pistachio contamination to Aspergillus flavus in Semnan provinc. IJNRS. 2011;2(3):1-6.
5. Nazemi L, Kordbacheh P, Ghazvini RD, Moazeni M, Dana MA, Rezaie S. Effects of thiamine on growth, aflatoxin production, and aflr gene expression in A. parasiticus. Curr Med Mycol. 2015;1(1):26. https://doi.org/10.18869/acadpub.cmm.1.1.26 PMid:28680978 PMCid:PMC5490319
6. Hajimohammadi B, Ehrampoush MH, Hashemi S , Khalatbari SL, Zare F, Taheri MS. The effect of electron irradiation on aflatoxin B1 in pistachio production process inoculated with Aspergillus flavus. Toloo e Behdasht. 2017;16(2);1-8.
7. Kman NE, Nelson RN. Infectious agents of bioterrorism: a review for emergency physicians. Ann Emerg Med. 2008;26(2):517-47. https://doi.org/10.1016/j.emc.2008.01.006
8. Carlson MP, Ensley SM. Understanding fungal (mold) toxins (mycotoxins): Cooperative Extension, Institute of Agriculture and Natural Resources, University of Nebraska-Lincoln; 2003.
9. Peraica M, Radić B, Lucić A, Pavlović M. Toxic effects of mycotoxins in humans. Bull World Health Organ. 1999;77(9):754-66. PMid:10534900 PMCid:PMC2557730
10. Hua S-ST, Baker JL, Flores-Espiritu M. Interactions of Saprophytic Yeasts with anor Mutant of Aspergillus flavus. Appl Environ Microbiol. 1999;65(6):2738-40. PMid:10347069 PMCid:PMC91404
11. Hua SST, Brandl MT, Hernlem B, Eng JG, Sarreal SBL. Fluorescent viability stains to probe the metabolic status of aflatoxigenic fungus in dual culture of Aspergillus flavus and Pichia anomala. Mycopathologia. 2011;171(2):133-8. https://doi.org/10.1007/s11046-010-9352-z PMid:20680685
12. Flaherty JE, Payne GA. Overexpression of alfR lead to up regulation of pathway and increased Aflatoxin production in A.flavus. Appl Environ Microbiol. 1997;63(10):3995-4000. PMid:16535712 PMCid:PMC1389268
13. Feng GH, Leonard TJ. Culture conditions control expression of the genes for aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis in Aspergillus parasiticus and A. nidulans. Appl Environ Microbiol. 1998;64(6):2275-7. PMid:9603849 PMCid:PMC106313
14. Ehrlich KC, Montalbano BG, Cotty PJ. Sequence comparison of aflR from different Aspergillus species provides evidence for variability in regulation of aflatoxin production. Fungal Genet Biol. 2003;38(1):63-74. https://doi.org/10.1016/S1087-1845(02)00509-1

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijmm.ir at 12:09 +0430 on Saturday September 8th 2018

15. Calvo AM, Wilson RA, Bok JW, Keller NP. Relationship between secondary metabolism and fungal development. Microbiol Mol Biol Rev. 2002;66(3):447-59. https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.447-459.2002 PMid:12208999 PMCid:PMC120793

16. van Egmond HP, Schothorst RC, Jonker MA. Regulations relating to mycotoxins in food. Anal Bioanal Chem. 2007;389(1):147-57. https://doi.org/10.1007/s00216-007-1317-9 PMid:17508207

17. da Gloria EM. Aflatoxin contamination distribution among grains and nuts. Aflatoxins-Detection, Measurement and Control: InTech; 2011.

18. Suanthie Y, Cousin MA, Woloshuk CP. Multiplex real-time PCR for detection and quantification of mycotoxigenic Aspergillus, Penicillium and Fusarium. J Stored Prod Res. 2009;45(2):139-45. https://doi.org/10.1016/j.jspr.2008.12.001

19. Shapira R, Paster N, Eyal O, Menasherov M, Mett A, Salomon R. Detection of aflatoxigenic molds in grains by PCR. Appl Environ Microbiol. 1996;62(9):3270-3. PMid:8795215 PMCid:PMC168121

20. Konietzny U, Greiner R. The application of PCR in the detection of mycotoxigenic fungi in foods. Braz J Microbiol. 2003;34(4):283-300. https://doi.org/10.1590/S1517-83822003000400001

21. Bankole SA, Adebanjo A. Mycotoxins in food in West Africa: current situation and possibilities of controlling it. Afr J Biotechnol. 2003;2(9):254-63. https://doi.org/10.5897/AJB2003.000-1053

22. Abd El-Aziz AR, Mahmoud MA, Al-Othman MR, Al-Gahtani MF. Use of selected essential oils to control aflatoxin contaminated stored cashew and detection of aflatoxin biosynthesis gene. Sci World J. 2015;2015. http://dx.doi.org/10.1155/2015/958192

23. Gradziel TM, Wang D. Susceptibility of California almond cultivars to aflatoxigenic Aspergillus flavus. HortScience. 1994;29(1):33-5.

24. Calvo AM, Wilson RA, Bok JW, Keller NP. Relationship between secondary metabolism and fungal development. Microbiol Mol Biol Rev. 2002;66(3):447-59. https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.447-459.2002 PMid:12208999 PMCid:PMC120793

25. OBrian G, Georgianna D, Wilkinson J, Yu J, Abbas H, Bhatnagar D, et al. The effect of elevated temperature on gene transcription and aflatoxin biosynthesis. Mycologia. 2007;99(2):232-9. https://doi.org/10.1080/15572536.2007.11832583

26. Diener UL, Davis ND. Limiting temperature and relative humidity for growth and production of aflatoxin and free fatty acids byAspergillus flavus in sterile peanuts. J Am Oil Chem Soc.1967;44(4):259-63. https://doi.org/10.1007/BF02639271

27. Şimşek O, Arici M, Demir C. Mycoflora of hazelnut (Corylus avellana L.) and aflatoxin content in hazelnut kernels artificially infected with Aspergillus parasiticus. Mol Nutr Food Res. 2002;46(3):194-6. https://doi.org/10.1002/1521-3803(20020501)46:3<194::AID-FOOD194>3.0.CO;2-D

28. Mojtahedi H, Rabie C, Lübben A, Steyn M, Danesh D. Toxic aspergilli from pistachio nuts. Mycopathologia. 1979;67(2):123-7. PMid:481560

29. Rahimi P, Sharifnabi B, Bahar M. Aspergillus species isolated from pistachio and determination of their aflatoxin production. Rostaniha. 2007;8(1):30-42.

30. Mimoune NA, Riba A, Verheecke C, Mathieu F, Sabaou N. Fungal contamination and mycotoxin production by Aspergillus spp. isolated from nuts and sesame seeds. JMBFS. 2016;5(4):301. https://doi.org/10.15414/jmbfs.2016.5.4.301-305

31. Najafi AK. Detection of Aspergillusflavus and Aspergillusparasiticus speciesproducing aflatoxin in pistachio by molecular methods. [dissertation]. Tehran Iran: University of Tehran; 2009.

32. Rahimi P, Sharifnabi B, Bahar M. Detection of aflatoxin in Aspergillus species isolated from pistachio in Iran. Journal of phytopathology. 2008;156(1):15-20. https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01312.x

33. Pourebrahim N, Yavarmanesh M. A molecular method for identification of aflatoxigenic fungi in pistachio of Khorasan region (Gonabad and Feyzabad). Iranian Food Science and Technology Research Journal. 2015;12(2):318-29.

34. Panjehkeh N, Khodadadi F, Ahmadinejad M, Salari M, Aminaee M. Detection of aflatoxigenic fungi in pistachio nuts by polymerase chain reaction. Archives of phytopathology and plant protection. 2012;45(2):133-7. https://doi.org/10.1080/03235408.2010.493757

www.SID.ir