Archive of SID

آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ٦٩، شماره ٢، اسفند ١٣٨٠

آلودگی تعدادی از هیبریدهای ذرت دانه‌ای به افلاتوکسین‌های B_1 و B_2 و قارچ مولد آن در مزرعه

Aflatoxins B_1, B_2 and *Aspergillus flavus* Contamination of Several Maize Hybrids in Field

جمیله طیبی و منصوره میرابوالفتحی
موسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی
(تاریخ دریافت: خرداد ١٣٨٠ ، تاریخ پذیرش: اسفند ١٣٨٠)

چکیده

میزان افلاتوکسین‌های G_2, G_1, B_2, B_1 در ارقام ذرت شامل Ksc 301 ، Ksc 604 ، Ksc 711,647 ، Sc 704 جمع‌آوری شده از جهات شمالی ، جنوبی، شرقی و غربی مزارع ذرت در شرق استان مازندران در سال‌های ١٣٧٦و ١٣٧٧ به روش شیمیائی "رومر" همراه با کروماتوگرافی روی لایه نازک بررسی و اندازه‌گیری گردید. میزان افلاتوکسین B_1 اندازه‌گیری شده در رقم Ksc 301 در سال‌های ٧٦ و ٧٧ به‌ترتیب ٢٩/١٧ppb و ١٥ppb بوده است، هم‌چنین در سال ١٣٧٧ در ارقام Ksc604 ، Ksc647 به‌ترتیب ١٧/٥ppb و ٣٥ ppb افلاتوکسین B_1 و در نمونه Ksc 647 میزان ٨/٧٥ ppb آفلاتوکسین B_2 نیز اندازه‌گیری گردید.

افلاتوکسین‌های G در نمونه‌های فوق مشاهده نشد. جهت بررسی آلودگی‌های قارچی، نمونه‌ها اکثراً از دانه‌های ذرت تغذیه شده بوسیله لارو حشرات و یا تغییر رنگ یافته انتخاب گردید. رقم Ksc 301 در سال ١٣٧٦ به میزان ٤٧ درصد به قارچ *Aspergillus flavus* Link آلوده بود و آلودگی در نمونه‌های سال ١٣٧٧ به‌ترتیب در ارقام Sc 704, Ksc 604, Ksc 647, Ksc 301 به میزان ٤٦، ٤٣، ١٦ و ٧٠ درصد تعیین گردیدند. این اولین گزارش آلودگی نمونه‌هائی از ذرت به افلاتوکسین در مزرعه ذرت ایران می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: ذرت، ارقام، *Aspergillus flavus* مزرعه، افلاتوکسین

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

افلاتوکسین‌ها به‌عنوان متابولیت‌های ثانوی بوسیله دو گونه قارچ *Aspergillus flavus* و *A. parasiticus* تولید میگردند. از نظر ساختمان شیمیایی کلیه آنها دارای هسته کومارینی می‌باشند که با یک بی فوران ترکیب شده است. علاوه بر آن یا دارای یک حلقه پنتانون (افلاتوکسین گروه B) و یا یک لاکتون ٦ ضلعی (افلاتوکسین گروه G) می‌باشند (Ciegler, 1974). در مورد آلودگی محصولات کشاورزی به آفلاتوکسین در ایران پژوهش‌های چندی درمورد آلودگی پسته به افلاتوکسین و روش‌های شیمیایی‌اندازه‌گیری آن‌بعمل‌آمده است (Ershad, 1973; Mojtehadi *et al.*, 1978,1979,1980; Khashabi and Tayebi, 1980; Tayebi, 1984).

ولی در مورد آلودگی ذرت به آفلاتوکسین بررسی قابل توجه و مستندی در ایران صورت نگرفته است. دانه ذرت بویژه از نظر چربی، پروتئین، کربوهیدرات‌ها و نمک‌های بعضی عناصر به گونه ایست که در دما و رطوبت مناسب محیط بسیار مطلوبی جهت رشد قارچ *Aspergillus* و تولید آفلاتوکسین می‌باشد (Asevedo *et al.*, 1993).

وجود آفلاتوکسین در ذرت از کشورهای ایالات متحده آمریکا (Gorman & Kang, 1991)، آمریکای جنوبی (Asevedo *et al.*, 1993)، آفریقا (Rheeder *et al.*, 1990; Setamou *et al.*, 1997) و هندوستان (Bilgrami *et al.*, 1992) گزارش گردیده است. اگرچه در بعضی سال‌ها میزان آلودگی کم بوده ولی بروز بحران جدی در صادرات ذرت این کشورها را سبب گردیده است. استرس خشکی، درجه حرارت بالا و آسیب ناشی از حشرات از جمله عوامل افزایش آلودگی می‌باشند (Wallin, 1986).

این پژوهش به منظور بررسی آلودگی ذرت به آفلاتوکسین و قارچ مولد آن درمزارع ذرت منطقه شرق مازندران با دمای ۳۸-۱۸ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی اغلب بیش از ۸۰٪ که محیط مناسبی را برای بیوسنتز آفلاتوکسین فراهم می‌سازد انجام یافت.

روش بررسی

نمونه برداری

ابتدا ارقام Sc704, Ksc711, Kse 647, Kse 604, Ksc 301 ذرت در پلات‌های مربع شکل به ابعاد ۵×۵ متر و در چهار تکرار کشت گردید و هرهیبرید در ۵ خط به‌طول ٤ متر و

www.SID.ir

Archive of SID

در ۱۵ کپه کشت شد. رقم 711 در سال دوم بعلت عدم کاشت آن در ایران حذف گردید. نمونه برداری در اواخر شهریور انجام گرفت و از هر پلات ۱۰ عدد آن بطـور تصـادفی و از اضـلاع شمالی، جنوبی، شرقی و غربی برداشت گردید و به این ترتیب از هر رقم ٤ تکرار که هر تکرار شامل ۱۰ عدد بلال بود حاصل شدکه در نتیجه برای ۵ رقم ذرت در سال ۱۳۷٦ مجموعـا" ۲۰ نمونه ۱۰ عددی و برای ٤ رقم در سال ۱۳۷۷ مجموعا" ۱٦ نمونـه ۱۰ عـددی نمونـه بـرداری گردید.

پس از دانه‌گیری نمونه‌ها، دانه‌ها آسیاب و سـپس بـا الـک مناسـب (۱٦ مـش) الـک گردیده و پس از اختلاط کامل پنجاه گرم از آن دقیقا" توزین و جهت اندازه‌گیری افلاتوکسـین آماده شد.

تجزیه شیمیایی

عصاره‌گیری از نمونه‌های ذرت و پالایش عصاره‌ها به روش"رومـر" (Romer. 1975) انجام گردید و ردیـابی آفلاتوکسـین در نمونـه‌های خـالص سـازی شـده بـا اسـتفاده از روش کروماتوگرافی روی لایه نازک(Thin Layer Chromatography) انجام شد.

صـفحات سیلیکاژل مـورد اسـتفاده صفحـات سـیلیکاژل ٦۰ مـرک بـدون اندیکـاتور فلورسنت، حلال بالا برنـده مخلـوط کلروفـرم: اسـتون (حجمـی ۱: ۹) و تـانک حـلال اشـباع بوده‌است.

جهت حذف مواد مزاحم و در واقع یک پالایش تکمیلی صفحات سـیلیکاژل پـس از نمونه‌گذاری با محلول نمونه و محلول استاندارد، ابتدا در تانک محتوی دی اتیل اتر کاملا" بی آب قرار داده شده و پس از رسیدن اتر به خط نشانه روی صفحه سیلیکاژل، صفحـه در محـل تاریک خشک و سپس کروماتوگرافی در تانک محتوی حلال بالا برنده ادامه یافته است. پس از آن تحت تابش پرتو ماوراء بنفش بـا طـول مـوج ۳٦۵ نـانومتر و مقایسـه بـا نمونـه اسـتاندارد افلاتوکسین‌ها شناسائی، تائید و آنگاه میزان آنها طبق رابطه زیر محاسبه گردید:

$$A=\frac{S.Y.V}{W.Z}$$

که در آن:

Λ= مقدار افلاتوکسین در نمونه(ppb)

www.SID.ir

Archive of SID

حجم محلـول افلاتوکسـین اسـتاندارد همگـن بـا حجـم نمونـه روی صفحـه سـیلیکاژل =S (میکرو لیتر)

غلظت افلاتوکسین استاندارد (میلی لیتر/ میکرو گرم)=Y

حجم حلال نهائی برای نمونه (میکرو لیتر)=V

وزن موثر (گرم)=W

حجم نمونه روی صفحه سیلیکاژل (میکرو لیتر)=Z

تائید افلاتوکسین

جهت تائید افلاتوکسین روی صفحه سیلیکاژل از دو روش یکـی اسـپری صفحـه بـا محلول آبی ۵۰٪ اسید سولفوریک و تغییر رنگ فلورسنت آبی افلاتوکسین به رنگ زرد و نیز از کروماتوگرافی روی لایه نازک در دو بعد اسـتفاده شـده اسـت کـه در هـر دو بعـد Rf نمونـه مساویRf افلاتوکسین استاندارد بوده است.

شناسائی قارچ

پس از دانه‌گیری بلال‌ها از هر نمونه ۲۰۰ بذر که اکثراً دارای آسیب ناشـی از تغذیـه حشرات و یا واجد لکه‌های سفید و تغییر رنگ بودند انتخاب گردید. بذور با استفاده از کلـرور جیوه یک در هزار ضد عفونی سطحی شده و پس از شستشو و خشک نمودن، ۱۰۰ عـدد بـذر روی محیط PDA و یک صد عدد روی کاغذ صافی مرطوب کشت گردیـد. تشـتک‌های پـتری حاوی بذور به مدت ۷ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس انکوباسـیون و سـپس مـورد بررسـی قارچ شناسی قرار گرفت.

نتیجه و بحث

از مجموع ۲۰ نمونه ذرت مورد بررسی در سال ۷۶ رقـم Ksc 301 دارای ۲۹/۱۷ppb آفلاتوکسین B_1 و۴۷٪ بذوربه قارچ *A.flavus* آلوده بوده‌اند. (جدول ۱) و از مجمـوع ۱۶ نمونـه مورد بررسی در سال ۷۷، ارقام Ksc 301 دارای ۱۵ ppb آفلاتوکسین B_1 و ۴۶٪ آلودگی به قـارچ مولد توکسین، رقم Ksc647 دارای ۳۵ ppb آفلاتوکسین B_1 و ۴۳٪ آلودگی قارچی بود. در رقـم اخیر آلودگی به آفلاتوکسین B_2 به میزان ۸/۷۵ ppb نیز مشاهده گردیـد و رقـم Ksc 604 دارای ۱۷/۵ ppb افلاتوکسین B_1 و آلودگی قارچ برابر ۱۶٪ بوده است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱، میزان آلودگی پنج رقم ذرت در مزرعه به آفلاتوکسین B_1 و B_2 (ppb) و قارچ *A. flavus* (%) در سال‌های ۷۶ و ۷۷

Table 1. Aflatoxin B_1, B_2 (ppb) and *Aspergillus flavus* (%) contamination of five cultivars of corn in field condition during 1997-1998.

Year	Ksc 301		Ksc 604		Sc704		Ksc 647		Ksc711	
	Af. B_1 ppb	A.fl %	Af. B_1 ppb	A.fl %	Af. B_1 Ppb	A.fl %	Af. B_1 ppb	A.f l. %	Af.B_1 ppb	A.fl. %
1997	29.17	47	ND		ND		ND		ND	
1998	15	46	17.5	16	ND	7	35*	43	ND	

* رقم Ksc 647 دارای ppb ۸/۷۵ افلاتوکسین B_2 نیز بوده است.

- درسال ۱۳۷۷ رقم Ksc711 بعلت عدم توصیه کاشت در ایران کشت نگردید.

ND = None Detected.
Af. = Aflatoxin.
A.fl.= *A. flavus*.

از مجموع نمونه‌های بررسی شده در سال ۱۳۷۶ ، در رقم Ksc 301 آلودگی به آفلاتوکسین و نیز قارچ مولد آن مشاهده گردیده است. در سال ۱۳۷۷ نیز تولید آفلاتوکسین با وجود قارچ مولد آن در نمونه‌های ذرت هم سو می‌باشد، که این مطلب بیوسنتز آفلاتوکسین را در شرایط مطلوب بوسیله قارچ مولد آن کاملا" توجیه می‌نماید. بنابر این با توجه به مقاومت قابل توجه مولکول آفلاتوکسین به تجزیه حرارتی که دمای ۲۶۹-۲۶۸ درجه سلسیوس برای آفلاتوکسین B_1 و ۲۴۵-۲۴۴ درجه سلسیوس برای آفلاتوکسین B_2 می‌باشد (Goldblatt, 1969). از طرف دیگر مشکلات توکسین زدایی علاوه بر هزینه گزاف در اکثر موارد سبب تغییر رنگ، طعم و بوی ماده غذائی می‌گردد. بنا براین بنظر می‌رسد موثرترین روش جهت کنترل آفلاتوکسین ذرت، دستیابی به هیبریدهای مقاوم به قارچ اسپرژیلوس فلاووس و هم چنین جلوگیری از آسیب دیدگی دانه‌های ذرت بوسیله آفات و اقداماتی جهت جلوگیری از رشد قارچ و تولید توکسین می‌باشد (Lillehoj *et al.*, 1979; Scott and Zummo, 1988; Widstrom *et al.*, 1987).

نتایج حاصله از این بررسی نشان میدهد که با توجه به شرایط مزارع ذرت بویژه از نظر دما و رطوبت از اواسط تیرماه (زمان تقریبی خوشه بندی ذرت) تا اواخر شهریور ماه، زمان برداشت رقم دیر کاشت Ksc301 ، رشد قارچ و بیوسنتز آفلاتوکسین کاملا" امکان پذیر بوده و مقادیر آن نیز قابل توجه است.

www.SID.ir

Archive of SID

سپاسگزاری

از همکاری و مساعدت بخش تحقیقات نهال و بذر قراخیل مازندران در نمونه‌برداری ذرت از مزرعه و همچنین تهیه آمار هواشناسی صمیمانه سپاسگزاریم.

نشانی نگارندگان: سرکار خانم مهندس جمیله طیبی، بخش تحقیقات آفت‌کش‌ها، موسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی، صندوق پستی ۱٤٥٤، تهران. سرکار خانم دکتر منصوره میرابوالفتحی، بخش تحقیقات بیماری‌های گیاهی، موسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی، صندوق پستی ۱٤٥٤، تهران.

www.SID.ir