آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۸۱، شماره ۲، اسفند ۱۳۹۲
Archive of SID

پراکنش سویه‌های غیرتوکسین‌زای قارچ *Aspergillus flavus* در مناطق پسته‌کاری ایران*

سید رضا فانی[۱]✉، محمد مرادی[۲]، حمید رضا زمانی زاده[۱]، منصوره میرابوالفتحی[۳] و کلودیا پروبست[٤]

۱-گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران؛ ۲- مؤسسه تحقیقات پسته کشور، رفسنجان؛ ۳- بخش تحقیقات بیماری‌های گیاهی، مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، تهران؛ ٤- دپارتمان بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه ایالتی واشنگتن، آمریکا

(تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۱؛ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۲)

چکیده

آلودگی پسته به زهرابه قارچی آفلاتوکسین از مهم‌ترین محدودیت‌ها در مصرف و تجارت پسته در ایران و جهان است. جدایه‌های غیرتوکسین‌زای قارچ *Aspergillus flavus* برای کاهش آفلاتوکسین پنبه دانه، بادام زمینی و ذرت در جهان استفاده می‌شوند و برنامه مطالعاتی وسیعی برای جایگزینی سویه‌های غیرتوکسین‌زای *A. flavus* در باغات پسته دنیا در حال انجام است. به منظور پایش و بررسی چگونگی پراکنش جدایه‌های غیرتوکسین‌زای *A. flavus* در باغات پسته، از خاک باغات و میوه پسته استان‌های کرمان، خراسان رضوی، قم، اصفهان، یزد، سمنان و مرکزی نمونه برداری شد. با استفاده از روش سری‌های رقت و محیط کشت AFPA، جدایه‌های مختلف متعلق به *Aspergillus* section *Flavi* جداسازی و خالص‌سازی شدند. جدایه‌ها بر اساس ویژگی‌های مرفولوژیکی و آغازگرهای اختصاصی در حد گونه شناسایی گردیدند. برای بررسی توانایی تولید آفلاتوکسین ابتدا جدایه‌ها بر اساس تولید نور فلورسنت اطراف پرگنه در محیط‌های نارگیل آگار و YES اصلاح شده با متیل‌بتاسیکلودکسترین و تغییر رنگ میسلیوم در تماس با بخار آمونیاک روی محیط‌های کشت PDA، YES و نارگیل آگار غربال شدند و سپس توانایی تولید آفلاتوکسین با روش کروماتوگرافی لایه نازک اندازه‌گیری شد. از بین ٦٨١ جدایه *Aspergillus* section *Flavi* به دست آمده، ٥٢٤ جدایه بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیک گونه *A. flavus* تشخیص داده شدند، از بین جدایه های مذکور۵۳ جدایه میوه و ۱۰ جدایه خاک قادر به تولید آفلاتوکسین نبودند. درصد جدایه‌های غیر توکسین‌زای جمع‌آوری شده از مناطق مختلف کشور از ٦/٢ تا ٢٥ درصد متغیر بود. نتایج همچنین حاکی از آن بود که به جز محیط کشت نارگیل آگار در ترکیب با بخار آمونیاک سایر روش‌های کشت، درصد جدایه‌های غیرتوکسین‌زا را بیشتر از تعداد واقعی آنها نشان می‌داد، از اینرو در آزمایشگاه‌های با امکانات محدود، استفاده از بخار آمونیاک می‌تواند به عنوان روشی کاربردی، ارزان و سریع با دقت قابل قبول جهت غربال جدایه های توکسین زا مورد استفاده قرارگیرد.

واژه‌های کلیدی: آفلاتوکسین، بیوکنترل، کروماتوگرافی لایه نازک، *A. flavus* .

Distribution of Nontoxigenic strains of *Aspergillus flavus* throughout pistachio growing areas in Iran

S. R. FANI[1]✉, M. MORADI[2], H. R. ZAMANIZADEH[1], M. MIRABOLFATHY[3] and C. PROBST[4]

1- Plant Pathology Department, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran; 2- Plant Protection Department, Iranian Pistachio Research Institute, Rafsanjan, Iran; 3- Plant Pathology Research Department, Iranian Plant Protection Institute, Tehran, Iran; 4- Department of Plant Pathology, Washington State University, IAREC-Prosser, USA

Abstract

Aflatoxins are highly toxic secondary metabolites produced by various *Aspergillus* species in food and feed. Nontoxigenic strains of *A. flavus* have been used for reducing aflatoxin of several crops. To determine the frequency of atoxigenic *A. flavus* population, samples were collected from different pistachio producing areas. A serial dilution method and AFPA medium was used to isolate *Aspergillus* section *Flavi* isolates. The ability of the isolates to produce aflatoxins was assayed using fluorescence detection (FD) around fungal colonies under UV 366 nm and color changing of colony after ammonia vapor (AV) exposure in the primary screening. First screening stage was validated by thin layer chromatography (TLC) after rice flour inoculation. The species of *A. flavus* were identified morphologically and molecularly based on species-specific primers. Overall, 524 isolates out of 681 isolates were identified as *A. flavus*. 53*A. flavus* isolates from nut and 10 isolates from soil did not produce any aflatoxins based on the methods used. Comparison of cultural and analytical methods showed FD methods overestimated the frequency of nontoxigenic strains while AV in combination with coconut agar medium produced similar results compare to TLC assays. The AV method can be used in the most laboratories as a practical, cheap, and rapid tool. Further efforts for assessment of competition potential of nontoxigenic strains versus toxigenic strains will be useful.

Key words: Aflatoxin, Biocontrol, Food safety, Thin layer chromatography.

---

*بخشی از پایان نامه دکتری نویسنده اول ارایه شده به دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران

✉ **Corresponding author: rezafani52@gmail.com**

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

پسته با تولیدی معادل ۲۰۰۰۰۰ تن با ارزش بالای صادراتی، پس از نفت مهم‌ترین منبع درآمد ارزی کشور است (Iran Pistachio Association, 2013) و آلودگی آن به آفلاتوکسین از سال ۱۳۵۰ چالش اصلی صادرات آن بوده است (Danesh *et al.* 1979). آفلاتوکسین‌های B1، B2، G1 و G2 عمدتاً بوسیله دو گونه قارچی *Aspergillus flavus* Link. و *Aspergillus parasiticus* Speare. تولید می‌شوند (Ito *et al*. 2001).

گونه‌های مختلف آسپرژیلوس به صورت خاک‌برد و هوابرد در بیشتر مناطق پسته کاری کشور سازگار شده‌اند و قادر به آلوده‌سازی مغز میوه‌های پسته‌های ترک خورده در طی تابستان و تولید آفلاتوکسین در باغ و پس از آن هستند (Moradi and Hokmabadi, 2011). روش‌های مختلفی جهت مدیریت آلودگی محصولات مختلف به آسپرژیلوس و یا آفلاتوکسین همچون راهکارهای فیزیکی، زراعی، بیولوژیکی و شیمیایی توصیه شده است، که هرکدام بسته به مکان، زمان، نوع محصول، قابلیت کاربردی بودن و کارایی، معایب و محاسن خاص خود را دارند (Barkai-Golan and Paster, 2008; Moradi and Hokmabadi, 2011). محدودیت‌های بهداشتی و قوانین و مقرارت بین المللی مانع کاربرد روش‌های متداول در مورد پسته شده است (Seeram *et al*. 2006; Brans, 2011; Racicot *et al.* 2012).

میکروارگانیسم‌هایی از جمله باکتری‌ها، مخمرها، اکتینومیست‌ها و استرین‌های غیر توکسین‌زای *A. flavus* قادر به کنترل بیولوژیکی استرین‌های توکسین‌زا هستند (Dorner, 2004). استرین‌های غیرتوکسین‌زای قارچ *A. flavus* در سطح گسترده روی تعدادی از محصولات همچون پنبه، ذرت، بادام زمینی، پسته، بادام و انجیر در حال استفاده یا توسعه می‌باشد و به عنوان یک روش مؤثر باعث کاهش ۷۰ تا ۹۰ درصدی جمعیت استرین‌های توکسین زا در مزرعه و باغ شده است (Brown *et al*. 1991; Cotty, 1994; Dorner 2004; Pitt and Hocking 2006; Michailides *et al*. 2007). تحقیقات انجام شده نشان داده است که استرین‌های غیر توکسین‌زا قادر به رقابت با استرین‌های توکسین‌زا و اشغال بستر هستند و این امر باعث کاهش جمعیت استرین‌های توکسین‌زا و میزان آفلاتوکسین در محیط غذایی و خاک شده است (Cotty and Bayman, 1993). غربال گری جمعیت‌های بومی قارچ آسپرژیلوس از نظر تولید و یا عدم تولید آفلاتوکسین، توانایی سازگاری با محیط و رقابت با جمعیت‌های توکسین‌زای غالب و سایر میکروارگانیسم‌ها جهت بدست آوردن جدایه‌های غیر توکسین زا باید مد نظر قرار گیرد.

روش‌های مختلفی برای بررسی توانایی تولید و یا عدم تولید آفلاتوکسین و یا غربال‌گری مورد استفاده قرار گرفته است، که شامل کاربرد محیط‌های کشت اختصاصی، آنالیز دستگاهی و ملکولی می‌باشند (Abbas *et al*. 2004). استفاده از روش‌های مبتنی بر محیط‌های کشت را می‌توان به عنوان روشی سریع، ارزان و قابل کاربرد برای غربال تعداد زیادی نمونه، مخصوصاً زمانی‌که تجهیزات لازم یا در دسترس نباشند و یا امکان کاربرد آنها برای تعداد زیاد نمونه با توجه به هزینه بالای آنها عملی نباشد، به کار گرفته شده‌اند. اساس این روش‌ها تغییر رنگ پرگنه به رنگ صورتی یا قرمز در حضور بخار آمونیاک (Saito and Machida, 1999) و یا تولید نور فلورسنت آبی رنگ اطراف پرگنه (Davis *et al*. 1987; Fente *et al*. 2001) در جدایه‌ها با توانایی تولید آفلاتوکسین می‌باشد. این در حالی است که جدایه‌ها با عدم توانایی تولید آفلاتوکسین بدون تغییر رنگ باقی مانده یا نور فلورسنتی از خود نشان نمی‌دهند. تأیید عدم توانایی تولید آفلاتوکسین در جدایه‌ها نیاز به استفاده از روش‌های آنالیز دستگاهی همچون TLC و HPLC دارد (Abbas *et al*. 2004).

یکی از عوامل مهم در امر کنترل بیولوژیکی، بومی بودن آنتاگونیست است که تا حدود زیادی کارایی عامل بیوکنترل را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Yin *et al*. 2008). لذا در این تحقیق پراکندگی و فراوانی جدایه‌های غیر توکسین زای *A. flavus* در

www.SID.ir

Archive of SID

مناطق مختلف پسته کاری با توجه به شرایط آب و هوایی، اقلیمی و سوابق کشت پسته با استفاده از روش‌های مختلف بررسی شد.

روش بررسی

۱- نمونه‌برداری: از مناطق پسته‌کاری استان‌های کرمان، خراسان رضوی، قم، اصفهان، یزد، سمنان و مرکزی در طول ماه‌های تابستان نمونه‌برداری صورت گرفت. در باغ‌های مورد مطالعه برای جداسازی *A. flavus* از خاک، ابتدا هر باغ در جهت‌های شمال، جنوب، شرق، غرب و مرکز تقسیم‌بندی شد و از هر جهت جغرافیایی ۶ زیر نمونه به فواصل ۱۵-۱۰ متر از خاک باغ تا عمق ۱۰ سانتی‌متری در محل سایه‌انداز درختان پسته نمونه برداری صورت گرفت. زیر نمونه‌ها با هم مخلوط شده و نمونه مخلوط به آزمایشگاه منتقل گردید. برای نمونه‌برداری از میوه پسته در هر باغ، از پسته‌های ترک خورده، روی زمین ریخته شده و پسته‌های سالم روی درخت به طور جداگانه ۱۰۰۰ عدد میوه پسته از ۱۰ درخت و همچنین از مراحل مختلف فرآوری پسته شامل مرحله قبل و بعد از پوست‌گیری، بعد از شست و شو و نم‌گیری، روی میدان (هر مرحله ۱۰۰۰ عدد میوه) نمونه‌برداری گردید. جهت نمونه‌برداری از انبارها، در طول فصول پاییز و زمستان از هر انبار تعداد ۱۰۰۰ عدد پسته به وزن تقریبی یک کیلوگرم از نقاط مختلف انبار در سه تکرار برداشت شد. کلیه نمونه‌ها بعد از ثبت مشخصات در صندوق یخ به آزمایشگاه منتقل شدند.

۲- جداسازی قارچ: جهت جداسازی از خاک سه نمونه ۵۰ گرمی از هر نمونه مخلوط خاک و برای جداسازی از میوه ۱۰۰ عدد میوه پسته در ۳ تکرار به فلاسک‌های حاوی ۴۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه با ۲۰۰ تا ۲۵۰ دور در دقیقه روی دستگاه تکان دهنده قرار داده شدند. پس از رقیق‌سازی سوسپانسیون حاصل، از رقت‌های ۱-۱۰ و ۲-۱۰ در ۴ تکرار و هر تکرار حاوی ۱۰۰ میکرولیتر روی تشتک‌های پتری حاوی محیط‌کشت (AFPA) پخش گردید (Gourama and Bullerman, 1995). تشتک‌های پتری در دمای ۳۰ °C به مدت ۳ تا ۷ روز در تاریکی نگهداری و کلنی‌های قارچ‌های گروه *Aspergillus* section *Flavi* جداسازی شدند.

۳- نگهداری جدایه‌ها: جدایه‌ها، پس از خالص سازی به روش تک اسپور، در لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت potato dextrose agar (PDA; Merck, Germany) و نیز در آب مقطر سترون برای نگهداری و کار روزانه استفاده گردید (Dhingra and Sinclair, 1995).

۴- بررسی توانایی تولید و یا عدم تولید آفلاتوکسین در جدایه‌های قارچ *Aspergillus flavus* :

الف- غربال‌گری اولیه توسط محیط کشت: جهت تشخیص جدایه‌های توکسین‌زا و غیر توکسین‌زا از دو روش: ۱- بررسی تولید و یا عدم تولید نور فلورسنت آبی رنگ اطراف کلنی‌های ۵-۳ روزه تحت طول موج ۳۶۶ نانومتر در محیط‌های کشت yeast extract sucrose agar (YES) غنی شده با متیل‌بتاسیکلودکسترین و نارگیل آگار (CAM) (Davis *et al*. 1987; Fente *et al*. 2001) و ۲- تغییر و یا عدم تغییر رنگ پشت کلنی به رنگ صورتی یا قرمز در معرض بخار آمونیاک بعد از ۳ تا ۵ روز در محیط‌های کشت PDA، YES و CAM استفاده گردید (Saito and Machida, 1999). برای تهیه محیط‌کشت نارگیل آگار مقدار ۲۰۰ گرم پودر نارگیل در یک لیتر آب جوش ریخته شد، پس از ۵ دقیقه و بهم زدن در چند نوبت و زمانی که عصاره نارگیل کاملاً خارج شد، مایع حاصل از ۴ لایه پارچه ململ عبور داده شد و ۲۰ گرم پودر آگار به آن اضافه گردید و به مدت ۲۰ دقیقه در فشار ۱/۵ اتمسفر و دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد در اتوکلاو سترون و به تشتک‌های پتری ۹ سانتی‌متری منتقل گردید. لازم به ذکر است که جدایه‌ها با عدم تولید نور فلورسنت و یا عدم تغییر رنگ پشت کلنی به صورتی و یا قرمز غیر توکسین‌زا در نظر گرفته می‌شدند.

www.SID.ir

Archive of SID

ب- استفاده از کروماتوگرفی لایه نازک: جدایه‌های غیرتوکسین‌زا که در غربال‌گری اولیه شناسایی شده بودند در لوله‌های آزمایش حاوی محیط PDA به صورت شیب دار کشت و به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند تا کاملاً اسپورزایی صورت گیرد. برای بررسی توانایی تولید آفلاتوکسین در جدایه‌ها از بستره برنج استفاده گردید (Wei and Jong, 1986). برای استخراج آفلاتوکسین از نمونه‌های برنج در ارلن‌ها، به محتوای هر ارلن ۳ گرم کلرید سدیم و ۱۲۵ میلی‌لیتر متانول ۵۵٪ اضافه گردید. ارلن‌ها به مدت نیم ساعت شیکر و پس از آن محتوای ارلن‌ها از کاغذ صافی عبور داده شد. در مرحله بعد، ۲۵ میلی‌لیتر از عصاره متانولی صاف شده به قیف جدا کننده منتقل گردید و ۲۵ میلی‌لیتر کلروفرم نیز به آن اضافه گردید. محتوای هر قیف جدا کننده حداقل ۳ دقیقه به شدت هم زده شد تا انتقال آفلاتوکسین به فاز کلروفرم به طور کامل انجام پذیرد. پس از جدا شدن کامل دو فاز موجود در قیف جدا کننده، لایه مربوط به فاز کلروفرمی خارج و اقدام به تبخیر حلال آن توسط سیستم تبخیر کننده دوار در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد گردید تا زمانی‌که حجم محلول به حدود ۱ میلی‌لیتر برسد. در ادامه کار، مقدار باقیمانده به یک لوله 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 (شامل مخلوطی از هگزان، کلروفرم و استون با نسبت‌های حجمی ۹۰: ۵: ۵) اضافه و محتوای آن به کمک شیکر لوله‌ای شدیداً هم زده شد. سپس به کمک سرنگ مخصوص نقطه‌گذاری (Capillary dispenser)، مرحله نقطه گذاری نمونه‌ها بر روی صفحه سیلیکاژل (F254) TLC انجام گردید. جهت شناسایی آفلاتوکسین، بر روی هر پلیت از مخلوطی از استانداردهای آفلاتوکسین‌های گروه B و G نیز جهت نقطه گذاری استفاده گردید (Sigma-Aldrich, Germany). پس از آن پلیت‌ها در مخزن 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، پلیت‌ها مدت کوتاهی برای تبخیر فاز متحرک در تاریکی نگهداری شدند و سپس برای بررسی تحت طول موج ۳۶۶ نانومتر اشعه فرابنفش (UV Cabinet, Camag, Switzerland) قرار گرفتند. از دستگاه چگالی‌سنج (Scanner3, Camag, Switzerland) و نرم افزار CATS3 نیز برای بررسی تولید و یا عدم تولید آفلاتوکسین در جدایه‌ها استفاده گردید و نتایج حاصل از جداسازی نمونه‌ها با نتایج مربوط به جداسازی اجزاء مخلوط استاندارد آفلاتوکسین در خصوص تولید و یا عدم تولید آفلاتوکسین های گروه B و G مقایسه گردید (Trucksess, 2000). نمونه‌هایی که در محیط کشت غیرتوکسین‌زا تشخیص داده شده بودند، برای اطمینان جهت غیرتوکسین‌زایی ۳-۲ بار به روش TLC بررسی شد.

۵- شناسایی گونه

- **مرفولوژیکی:** برای شناسایی مرفولوژیک جدایه‌ها در سطح گونه، از ویژگی‌هایی همچون شکل، رنگ، و اندازه: کنیدیوفور، کنیدی، وزیکول و سلول پایه و همچنین مشخصات استریگماتا، رشد در محیط‌های کشت و دماهای مختلف استفاده گردید (Klich, 2002).

- **بررسی مولکولی:** ۶۳ جدایه‌ی غیر توکسین‌زای حاصل از غربال‌گری جدایه‌ها با استفاده از روش‌های ذکر شده در بالا، به مدت ٤٨ ساعت در محیط PDB کشت داده شدند. میسیلیوم با استفاده از پمپ خلاء و کاغذ صافی شماره ٤ از محیط کشت جداسازی گردید. توده میسیلیومی در هاون‌های چینی سترون در ازت مایع ساییده و پودر گردید. جهت استخراج DNA از روش اصلاح شده CTAB (Moradi *et al.* 2011) استفاده گردید. کیفیت و کمیت DNA خالص شده با استفاده از سنجش‌های الکتروفورزی و اسپکتوفتومتری تعیین گردید. DNA خالص شده در بافر TE و ۲۰°C- برای آزمایشات بعدی نگهداری شد. از آغازگرهای اختصاصی

www.SID.ir

Archive of SID

گونه *A. flavus* (FLAVIQ1: 5′ GTCGTCCCCTCTCCGG 3′ FLAQ2: 5′ CTGGAAAAAGATTGATTTGCG 3′) طراحی شده توسط Sardinas *et al.* (2011) برای شناسایی گونه استفاده گردید. واکنش‌های PCR در دستگاه ترموسایکلر (Primus, MWG Biotech, UK) انجام و نتایج به صورت وجود و یا عدم وجود قطعه تکثیر شده روی ژل آگاروز در مقایسه با نشانگر DNA و همچنین جدایه استاندارد *A. flavus* بررسی شد.

نتیجه و بحث

– **جدایه های به دست آمده:** در این تحقیق فراوانی جدایه‌های غیر توکسین‌زا و توکسین‌زا در استان‌های کرمان (کرمان، رفسنجان، زرند، سیرجان، شهربابک)، خراسان رضوی (بردسکن، خلیل آباد، فیض آباد)، اصفهان (اصفهان، آران و بیدگل)، یزد (بفروییه میبد)، سمنان (دامغان)، قم (قمرود) و مرکزی (ساوه) با استفاده از روش‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. در مجموع تعداد ۲۰۵ نمونه میوه پسته و ۲۰ نمونه خاک از ۵ استان عمده پسته‌کاری کرمان، خراسان رضوی، اصفهان، یزد، قم، سمنان و مرکزی جمع‌آوری و جهت جداسازی قارچ‌های مورد نظر بررسی شد.

از نمونه‌های جمع آوری شده، با استفاده از محیط AFPA تعداد ۶۸۱ جدایه متعلق به *Aspergillus* section *Flavi* به دست آمد. از این تعداد جدایه، ۵۲۴ عدد براساس ویژگی‌های ریخت شناسی تحت گونه *A. flavus* شناسایی گردیدند (جدول ۱). فراوانی جدایه‌های غیر توکسین‌زا به ترتیب برای استان‌های کرمان، اصفهان، قم، خراسان رضوی، یزد، سمنان و مرکزی ۶/۲، ۱۵/۴، ۱۳، ۱۷/۶، ۲۵، ۹/۱ و ۱۱/۱ درصد متغیر بود.

– **غربال‌گری جدایه‌های غیرتوکسین‌زا:** نتایج حاصل از بررسی ۵۲۴ جدایه از نظر توانایی تولید آفلاتوکسین نشان داد که بر اساس عدم تولید تابش فلورسنت اطراف پرگنه‌های سه روزه جدایه‌ها به ترتیب ۱۷۵ و ۱۸۸ جدایه با استفاده از محیط کشت نارگیل آگار و YES اصلاح شده با متیل‌بتاسیکلودکسترین غیر توکسین‌زا تشخیص داده شدند. در حالی که بر اساس عدم تغییر رنگ پشت کلنی به رنگ صورتی یا قرمز در روش آمونیاک به ترتیب روی محیط‌های کشت YES، PDA و CAM، ۱۳۲، ۱۰۱ و ۸۲ جدایه غیر توکسین‌زا بودند. در نتایج حاصل از کاربرد روش‌ها و محیط‌های کشت مختلف غیر توکسین‌زایی این ۸۲ جدایه مشترک بود.

– **تشخیص اختصاصی گونه به روش مولکولی:** کاربرد آغازگرهای اختصاصی نشان داد که از بین ۸۲ جدایه غیرتوکسین‌زا تنها ۶۳ عدد از آن‌ها متعلق به گونه *A. flavus* بودند (جدول ۲). این جدایه‌ها با آغازگرهای اختصاصی گونه، فقط یک قطعه DNA به اندازه ۱۰۰bp تولید نمودند، در حالی‌که در ۱۹ جدایه دیگر قطعه مورد نظر تولید نگردید.

آلودگی محصولات کشاورزی و فرآورده‌های آنها به زهرابه‌های قارچی با توجه به سرطان‌زا بودن برخی از آنها و سمیت بالا برای انسان و دام مورد توجه سازمانهای بهداشت جهانی و کشورهای مختلف بوده و مقررات و قوانین ویژه‌ای برای تولید، مصرف و واردات آنها تنظیم نموده‌اند. با توجه به جایگاه صادراتی پسته و تاثیر گذاری آفلاتوکسین‌ها در این خصوص، استفاده از جدایه‌های غیرتوکسین‌زا می تواند در کاهش سطوح آفلاتوکسین‌ها قبل و بعد از برداشت و همچنین کاربرد آن در محصولات دیگر از جایگاه ویژه‌ای برخوردار باشد.

در مطالعه حاضر فراوانی جدایه‌های غیر توکسین‌زا و توکسین‌زا در مناطق مختلف پسته‌کاری کشور با استفاده از روش‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. قارچ‌های گروه *A. flavus* با فراوانی متفاوت از بیشتر نمونه‌های مورد بررسی شامل میوه و خاک جداسازی شد و بیشترین جمعیت مربوط به گونه *A. flavus* بود.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- تعداد، منبع و فراوانی (٪) جدایه‌های توکسین‌زا و غیرتوکسین‌زا از استان‌های مختلف

Table 1. Number, source and frequency of toxigenic and nontoxigenic isolates from different provinces

تعداد سویه های غیرتوکسین‌زا Number of nontoxigenic strains		درصد فراوانی جدایه‌های غیرتوکسین‌زا Frequency of Nontoxigenic isolates	*A. flavus*	*Aspergillus* section *Flavi*	استان Province
خاک Soil	میوه Fruit				
3	11	6.2	225	293	Kerman
2	10	15.4	78	101	Isfahan
1	2	13	23	30	Ghom
2	28	17.6	170	221	Razavi Khorasan
1	1	25	8	10	Yazd
1	0	9.1	11	14	Semnan
0	1	11.1	9	12	Markazi
10	53		524	681	Total

جدول ۲- مشخصات جدایه‌های غیرتوکسین‌زای *A. flavus* به دست آمده از استان‌های مختلف

Table 2. Characteristics of nontoxigenic isolates obtained from different provinces

توکسین‌زایی در محیط کشت CAM و روش TLC Toxigenecity in CAM and TLC	تشخیص مرفولوژیکی/مولکولی Morphological/Molecular detection	منبع جداسازی Source of isolation	محل جمع آوری Location	جدایه Isolate	ردیف No.
Negative	*A. flavus*	Fruit	Bardaskan	KhN46	1
Negative	*A. flavus*	Fruit	Feizabad	KhN301	2
Negative	*A. flavus*	Fruit	Feizabad	KhN302	3
Negative	*A. flavus*	Fruit	Khalilabad	KhN64	4
Negative	*A. flavus*	Fruit	Bardaskan	KhN69	5
Negative	*A. flavus*	Fruit	Feizabad	KhN1061	6
Negative	*A. flavus*	Fruit	Feizabad	KhN1062	7
Negative	*A. flavus*	Fruit	Feizabad	KhN1091	8
Negative	*A. flavus*	Fruit	Feizabad	KhN1092	9
Negative	*A. flavus*	Fruit	Feizabad	KhN1096	10
Negative	*A. flavus*	Fruit	Feizabad	KhN10911	11
Negative	*A. flavus*	Fruit	Feizabad	KhN10913	12
Negative	*A. flavus*	Fruit	Feizabad	KhN1106	13
Negative	*A. flavus*	Fruit	Feizabad	KhN1109	14
Negative	*A. flavus*	Fruit	Feizabad	KhN11017	15
Negative	*A. flavus*	Fruit	Feizabad	KhN10811	16
Negative	*A. flavus*	Fruit	Feizabad	KhN1087	17
Negative	*A. flavus*	Fruit	Feizabad	KhN1121	18
Negative	*A. flavus*	Fruit	Feizabad	KhN1122	19
Negative	*A. flavus*	Fruit	Feizabad	KhN1129	20
Negative	*A. flavus*	Fruit	Feizabad	KhN11413	21
Negative	*A. flavus*	Fruit	Feizabad	KhN11415	22
Negative	*A. flavus*	Fruit	Feizabad	KhN11417	23
Negative	*A. flavus*	Fruit	Feizabad	KhN11510	24
Negative	*A. flavus*	Fruit	Feizabad	KhNF12	25
Negative	*A. flavus*	Fruit	Feizabad	KhN1134	26
Negative	*A. flavus*	Fruit	Feizabad	KhN1123	27
Negative	*A. flavus*	Fruit	Feizabad	KhNF1	28
Negative	*A. flavus*	Soil	Feizabad	KhS21	29
Negative	*A. flavus*	Soil	Feizabad	KhS39	30
Negative	*A. flavus*	Fruit	Zarand	Kn13	31

www.SID.ir

Archive of SID

ادامه‌ی جدول ۲- مشخصات جدایه‌های غیرتوکسین‌زای *A. flavus* به دست آمده از استان‌های مختلف

Table 2 continued. Characteristics of nontoxigenic isolates obtained from different provinces

ردیف No.	جدایه Isolate	محل جمع آوری Location	منبع جداسازی Source of isolation	تشخیص مرفولوژیکی/مولکولی Morphological/Molecular detection	توکسین‌زایی در محیط کشت CAM و روش TLC Toxigenecity in CAM and TLC
32	Kn35	Kerman	Fruit	*A. flavus*	Negative
33	Kn341	Rafsanjan	Fruit	*A. flavus*	Negative
34	Kn2181	Rafsanjan	Fruit	*A. flavus*	Negative
35	Kn880	Rafsanjan	Fruit	*A. flavus*	Negative
36	Kn176	Rafsanjan	Fruit	*A. flavus*	Negative
37	Kn303	Rafsanjan	Fruit	*A. flavus*	Negative
38	Kn150	Rafsanjan	Fruit	*A. flavus*	Negative
39	Kn85	Kerman	Fruit	*A. flavus*	Negative
40	Kn22	Kerman	Fruit	*A. flavus*	Negative
41	Kn102	Kerman	Fruit	*A. flavus*	Negative
42	KS59	Rafsanjan	Soil	*A. flavus*	Negative
43	KS1761	Shahrbabak	Soil	*A. flavus*	Negative
44	KS130	Rafsanjan	Soil	*A. flavus*	Negative
45	IN221	Aranobidgol	Fruit	*A. flavus*	Negative
46	IN222	Aranobidgol	Fruit	*A. flavus*	Negative
47	IN224	Aranobidgol	Fruit	*A. flavus*	Negative
48	IN227	Aranobidgol	Fruit	*A. flavus*	Negative
49	IN1912	Isfahan	Fruit	*A. flavus*	Negative
50	IN261	Aranobidgol	Fruit	*A. flavus*	Negative
51	IN1911	Isfahan	Fruit	*A. flavus*	Negative
52	IN1921	Isfahan	Fruit	*A. flavus*	Negative
53	IN221	Aranobidgol	Fruit	*A. flavus*	Negative
54	IN642	Isfahan	Fruit	*A. flavus*	Negative
55	IS226	Aranobidgol	Soil	*A. flavus*	Negative
56	IS221	Aranobidgol	Soil	*A. flavus*	Negative
57	QN25	Ghomroud	Fruit	*A. flavus*	Negative
58	QN502	Ghomroud	Fruit	*A. flavus*	Negative
59	QS282	Ghomroud	Soil	*A. flavus*	Negative
60	YN3	Yazd. Bafruye	Fruit	*A. flavus*	Negative
61	YS14	Yazd, Bafruye	Soil	*A. flavus*	Negative
62	SS24	Damghan	Soil	*A. flavus*	Negative
63	MN282	Saveh	Fruit	*A. flavus*	Negative

نتایج همچنین نشان داد که جمعیت های *A. flavus* از نظر تولید آفلاتوکسین متنوع بوده و در مناطق مختلف مورد بررسی ٦/٢ تا ٢٥ درصد جدایه ها قادر به تولید آفلاتوکسین‌های گروه G و B نبودند.

این اولین مطالعه در خصوص پراکنش جدایه‌های غیر توکسین‌زای بومی در مناطق مختلف پسته‌کاری کشور است که تشخیص غیر توکسین‌زایی با استفاده از روش‌های مختلف انجام شده است. این جدایه‌ها می‌توانند در کاهش جمعیت سویه‌های توکسین‌زا در سطح باغ مؤثر واقع شوند، که نیاز به تحقیقات بیشتر در خصوص پایداری غیر توکسین‌زایی، توانایی رقابتی آنها با سایر جمعیت‌ها و استقرار تحت شرایط باغ‌های پسته دارد. بر اساس نتایج اولیه، الگوی حذف در جدایه‌های غیرتوکسین‌زای بدست آمده از یک ژن تا بیشتر خوشه‌ژنی متفاوت می‌باشد که این امر احتمال برگشت پذیری توکسین زایی را به حداقل می‌رساند. با توجه به شرایط آب و هوایی الگوی خاصی در فراوانی جدایه‌های غیر توکسین زا در مناطق مختلف پسته کاری کشور مشاهده نگردید. علت اصلی تفاوت بین فراوانی جدایه‌های توکسین‌زا و غیر توکسین‌زا در

www.SID.ir

Archive of SID

باغ‌های پسته به خوبی مشخص نبود. به نظر می‌رسد یکی از دلایل آن عدم تعیین نقش اکولوژیکی آفلاتوکسین باشد و ممکن است در رقابت قارچ با سایر میکروارگانیسم‌ها آفلاتوکسین نقش حفاظتی ایفا نماید (Angle and Wanger, 1981). این موضوع نیز باید اضافه گردد که تولید آفلاتوکسین‌ها در رشد قارچ، شدت بیماری‌زایی و توانایی رقابتی در بین جدایه‌های توکسین‌زا و غیرتوکسین‌زا نقشی ندارد (Donner *et al*. 2009; Donner *et al.* 2010). اشاره به این نکته حائز اهمیت است که تولید آفلاتوکسین توسط قارچ نیازمند صرف انرژی می‌باشد و از دست دادن این توانایی در جدایه‌های غیر توکسین‌زا ممکن است باعث تواناتر شدن قارچ در رشد و اشغال سریع‌تر محل‌های اکولوژیکی گردد. از طرف دیگر جدایه‌های توکسین‌زا و غیرتوکسین‌زا در محل‌های اکولوژیکی مشترک وجود دارند و حذف رقابتی از مکانیسم‌های کنترل بیولوژیکی می‌باشد (Cotty and Bayman, 1993; Cotty, 1994; Donner *et al*. 2009). در جنوب ایالات متحده جمعیت عمده جدایه‌های *A. flavus* به دست آمده از مزارع ذرت توکسین‌زا بودند (Cotty 1997, Horn and Dorner, 1999)، در آرژانتین کمتر از ۳۰٪ جدایه‌های *A. flavus* قادر به تولید آفلاتوکسین بودند (Vaamonde *et al*. 2003). مطالعات انجام شده روی ۸٦٤ جدایه *A. flavus* از باغ‌های پسته کالیفرنیا نشان داد که جدایه‌های غیر توکسین‌زا ۵/۸٪ فراوانی را به خود اختصاص داده‌اند (Michailides *et al*. 2007). فراوانی جدایه‌های غیرتوکسین‌زای *A. flavus* در اکثر مزارع ذرت مورد بررسی نیجریه بالاتر از سویه‌های توکسین‌زا بود بطوریکه ۵٦٪ از کل جدایه‌ها غیرتوکسین‌زا تشخیص داده شدند (Donner *et al.*, 2009)، در حالی‌که در مزراع ذرت کنیا ۳۳٪ از جدایه‌های *A. flavus* غیرتوکسین‌زا بودند (Probst *et al*. 2011). در این خصوص مطالعات انجام شده حاکی از یک ارتباط منفی بین عرض جغراقیایی و تولید آفلاتوکسین در محصولات مختلف می‌باشد (Cotty, 1990) . در ایالات متحده در نواحی جنوبی تولید بادام زمینی فراوانی جدایه‌های L بیشتر از نواحی شمالی است (Horn and Dorner, 1999). تحقیقات انجام شده در نیجریه نیز بیانگر فراوانی متفاوت جدایه‌ها بسته به شرایط جغرافیایی و اقلیم می‌باشد (Donner *et al*. 2009). از طرف دیگر تنوع در ترکیب جمعیتی جدایه‌های این قارچ تحت تأثیر عواملی همچون غالبیت ژنتیکی، شرایط محیطی و نوع بستر غذایی می‌باشد و تنوع در تولید آفلاتوکسین به دلیل اهمیت بهداشتی و امنیت غذایی آن از همه بیشتر مورد توجه قرار گرفته است (Bayman and Cotty, 1993).

شاید تفاوت در فراوانی جدایه‌های توکسین‌زا و غیرتوکسین‌زا را بتوان در سیستم تک‌کشتی پسته، نیازمندی‌های اکولوژیکی و بیولوژیکی جدایه‌ها در طبیعت، برهمکنش با سایر میکروارگانیسم‌ها و نقش آفلاتوکسین در حذف سایر میکروارگانیسم‌ها دانست. تحت شرایط آزمایشگاهی چندین مرتبه کشت مجدد *A. flavus* روی محیط‌های کشت مصنوعی باعث از دست دادن توانایی تولید آفلاتوکسین و تغییر در ویژگی‌های ریخت‌شناسی همچون تولید میسیلیوم، اسپور و اسکلروت می‌گردد. این در حالی است که تحت شرایط طبیعی و وجود تنش‌های زنده و غیر زنده باعث حفظ توانایی تولید آفلاتوکسین و خصوصیات مرفولوژیکی تیپ وحشی می‌گردد (Horn and Dorner, 2002; Chang *et al.* 2007). تحقیقات حاکی از تأثیر آفلاتوکسین در کاهش جمعیت قارچ‌ها، باکتری‌ها و اکتینومیست‌ها در خاک می‌باشد، که با افزودن مواد آلی به خاک این تاثیر افزایش می‌یابد (Angle and Wanger, 1981)، این موضوع نشان دهنده نقش آفلاتوکسین‌ها در توانایی رقابتی جدایه‌ها و یا گونه‌های تولیدکننده در برابرسایر میکروارگانیسم‌ها می باشد.

برای غربال‌گری توکسین‌زایی و یا عدم آن در جدایه‌های *A. flavus* روش‌های مختلفی بر پایه سنجش میزان فلورسنت به صورت ظاهری و یا در عصاره، تغییر رنگ میسلیوم قارچی، و جذب اشعه UV به صورت کمی یا کیفی بر پایه

www.SID.ir

Archive of SID

روش های کشت و یا آنالیز دستگاهی مورد استفاده قرار می‌گیرند. مقایسه روش‌های کشت مورد استفاده در این تحقیق نشان داد که به استثنای روش آمونیاک در ترکیب با محیط کشت نارگیل آگار سایر محیط‌های کشت مورد استفاده باعث تخمین بیش از فراوانی واقعی جدایه‌های غیر توکسین‌زا می‌گردند. این موضوع نشان دهنده عدم کارآیی عموم روش‌های کشت برای تشخیص جدایه‌ها غیرتوکسن‌زای کاذب (با توانایی تولید آفلاتوکسین پایین) و تفکیک آن‌ها از جدایه‌های غیرتوکسین‌زای واقعی است. ترکیب آمونیاک با محیط کشت نارگیل اگار در مقایسه با سایر محیط‌های کشت، بعد از ۵ روز به خوبی توانست جدایه‌های غیر توکسین‌زای کاذب را مشخص نماید، که مزیت نسبی به شمار می‌رود. از مزایای دیگر محیط کشت نارگیل آگار می‌توان به زمینه سفید و روشن این محیط و تمایز رنگ بهتر پرگنه‌های توکسین‌زا، قابل کاربرد بودن در اکثر آزمایشگاه‌ها با امکانات محدود، ارزان بودن، سادگی و عدم نیاز به امکانات پیچیده آزمایشگاهی، نیروی متخصص و سرعت بالا جهت غربال‌گری توده‌ای تعداد زیاد جدایه اشاره نمود. مزیت دیگر محیط نارگیل آگار نسبت به سایر محیط‌ها طبیعی‌تر بودن بستر رشد قارچ برای توکسین‌زایی می‌باشد. جنبه‌های مختلف روش‌های کشت مورد استفاده برای بررسی توانایی تولید و یا عدم تولید توسط محققین مختلف مورد بررسی قرار گرفته است (Abbas *et al*. 2004). به هر حال تشخیص قطعی جدایه‌های غیر توکسین‌زا نیاز به استفاده از روش‌های آنالیز دستگاهی با دو و یا سه بار تکرار دارد. در تحقیق حاضر بسترهایی همچون آرد پسته، ذرت و آرد برنج استفاده گردید، که در مجموع بستره آرد برنج نسبت به دو بستره دیگر با توجه به روش مورد استفاده برتری داشت. کاربرد روش کرماتوگرافی لایه نازک در بسیاری از تحقیقات در خصوص تشخیص جدایه‌های غیر توکسین‌زا جهت غربال‌گری و یا تأیید روش‌ها بر پایه محیط کشت مورد استفاده قرار گرفته است (Probst *et al*. 2011).

سپاسگزاری

از مسئولین و کارکنان محترم مؤسسه تحقیقات پسته کشور به لحاظ همکاری در اجرای بخشی از این تحقیق و در اختیار گذاشتن تعدادی از جدایه‌های قارچی مورد نیاز تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

ABBAS, H. K., W. T. SHIER, B. W. HORN and M. A. WEAVER, 2004. Cultural Methods for Aflatoxin Detection, Journal of Toxicology, 23: 295-319.

ANGLE, J. S. and G. H. WANGER, 1981. Aflatoxin B1 effects on soil microorganisms. Soil biology and biochemistry, 13: 381-384.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists), 2000. Official methods 970.45 Aflatoxins in Peanuts and Peanut Products BF Method, 14th edn. Arlington. VA 22209 USA:

BARKAI-GOLAN, R. and N. PASTER, 2008. Mycotoxins in fruits and vegetables. Burlington, Academic Press. 395 pp.

BRANS, H. 2011. Food and Agricultural Import Regulations and Standards Narrative, USDA Foreign Agricultural Service. Global Agriculture Information, 42 pp.

BROWN, R. L., P. J. COTTY and T. E. CLEAVELAND, 1991. Reduction in aflatoxin content of maize by atoxigenicstrains of *Aspergillus flavus*. Journal of Food Protection, 54: 623-626.

CHANG, P. K., J. R. WILKINSON, B. W. HORN, J. YU, D. BHATANGAR and T. E. Cleveland, 2007. Genes differentially expressed by *Aspergillus flavus* strains after loss of aflatoxin production by serial transfers. Appllied Microbiology Biotechnology, 77: 917–925.

COTTY, P. J. 1989. Virulence and cultural characteristics of two *Aspergillus flavus* strains pathogenic on cotton. Phytopathology, 79: 808-814.

COTTY, P. J. 1994. Influence of field application of an atoxigenic strain of *Aspergillus flavus* on the populations of *A. flavus* infecting cotton bolls and on the aflatoxin content of cottonseed. Phytopathology, 84(11): 1270-1277.

www.SID.ir

Archive of SID

COTTY, P. J. and P. BAYMAN, 1993. Competitive exclusion of a toxigenic strain of *Aspergillus flavus* by an atoxigenic strain. Phytopathology, 83(12): 1283-1287.

COTTY, P. J. 1997. Aflatoxin-producing potential of communities of *Aspergillus* section *Flavi* from cotton producing areas in the United States. Mycological Research 101: 698-704.

DANESH, D., H. MOJTAHEDI, R. BARNETT and A. CAMPBELL, 1979. Correlation between climatic data and aflatoxin contamination of Iranian pistachio nuts. Phytopathology, 69: 715-716.

DAVIS, N. D., S. K. IYER and U. L. DIENER, 1987. Improved method of screening for aflatoxin with a coconut agar medium. Applied and Environmental Microbiology, 53(7): 1593-1595.

DONNER, M., J. ATEHNKENG, R. A. SIKORA, R., BANDYOPADHYAY and P. J. COTTY, 2009. Distribution of *Aspergillus* section *Flavi* in soils of maize fields in three agroecological zones of Nigeria. Soil Biology and Biochemistry, 41(1): 37-44.

DONNER, M., J. ATEHNKENG, R. A. SIKORA, R., BANDYOPADHYAY and P. J. COTTY, 2010. Molecular characterization of atoxigenic strains for biological control of aflatoxins in Nigeria. Food Additives and Contaminants, 27(5): 576-590.

DORNER, J. W. 2004. Biological control of aflatoxin contamination of crops. Journal of Toxicology Toxin Review, 23: 425-450.

FENTE, C. A., J. J. ORDAZ, B. I. VAZQUEZ, C. M. FRANCO and A. CEPEDA, 2001. New additive for culture media for rapid identification of aflatoxin-producing *Aspergillus* strains. Applied. Microbiology and Biotechnology. 67(10): 4858-4862.

GOURAMA, H. and L. B. BULLERMAN, 1995. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: aflatoxigenic fungi of consern in foods and feeds: A review. Journal of Food Protection, 58: 1395-1404.

HORN, B. W. and J. W. DORNER 2002. Effect of competition and adverse culture conditions on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* through successive generations. Mycologia. 9: 741–751.

HORN, B. W. and J. W. DORNER, 1999. Regional differences in production of aflatoxin B1 and cyclopiazonic acid by soil isolates of aspergillus flavus along a transect within the United States. Applied, Environental Microbiology, 65.

IRAN PISTACHIO ASSOCIATION, 2013. Statistical Archive from http://www.iranpistachio.org.

ITO, Y., S. W. PETERSON, D. T. WICKLOW and T. GOTO, 2001. *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *Flavi*. Mycological Research.105(2): 233-239.

KLICH, M. A. 2002. Identification of common Aspergillus species. Central voor Schimmelcultures, Utrech, The Netherland; pp 116.

MICHAILIDES, T. J., M. DOSTER, P. J. COTTY, D. MORGAN, L. BOCKLER, D. FELT and H. REYES, 2007. Aflatoxin control in pistachios: biocontrol using the atoxigenic strain AF36, survival of AF36, and EUP status. In Proceedings of the 2007 Annual Multicrop Aflatoxin/Fumonisin Elemination and Fugal Genomics Workshop. pp. 54-55.

MORADI, M. and H. HOKMABADI, 2011. Control of Mycotoxin Bioactives in Nuts: Farm to Fork. Fruit and Cereal Bioactives, Sources, Chemistry, and Applications. O. Tokusoglu, Hal III, C. Turkey, CRC Press. 1: 291-315.

MORADI, M., E. C. OERKE, U. STEINER, D. TESFAYE, K. SCHELLANDER and H. W. DEHNE, 2011. Microbiological and Sybr® Green Real_Time PCR Detection, of Major *Fusarium* Head Blight Pathogens on Wheat Ears. Microbiology, Vol. 79, 5: 646–654.

PITT, J. I. and A. D. HOCKING, 2006. Mycotoxins in Australia: biocontrol of aflatoxin in peanuts. Mycopathologia, 162(3): 233-243.

PROBST, C., R. BANDYOPADHYAY, L. E. PROCE and P. J. COTTY, 2011. Identification of atoxigenic *Aspergillus flavus* isolates to reduce aflatoxin contamination of maize in Kenya. Plant Disease, 95(2): 212-218.

RACICOT, K., A. CRAVEN and C. Y. O. CHEN, 2012. Bleaching augments lipid peroxidation products in pistachio oil and its cytotoxicity European Journal of

www.SID.ir

Archive of SID

Lipid Science and Technology, 114(12): 1362-1372.

SAITO, M. and S. MACHIDA, 1999. A rapid identification method for aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. Mycoscience 40: 205-208.

SARDINÄS, N., C. VÁZQUEZ, J. GIL-SERNA M. T. GONZÁLEZ-JAÉN and B. PATIŃO, 2011. Specific detection and quantification of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in wheat flour by SYBR® Green quantitative PCR. International Journal of Food Microbiology, 145(1): 121-125.

SEERAM, N. P., Y. ZHANG, S. M. HENNING, R. LEE, Y. NIU, G. LIN and D. HERBER, 2006. Pistachio skin phenolics are destroyed by bleaching resulting in reduced antioxidative capacities. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 54(19): 7036-40.

TRUCKSESS, M. W. 2000. Natural toxins (Chapter 49), in Official Methods of Analysis, 17th Edition (Horwitz, W., ed.) Gaithersburg, MD: AOAC International, pp. 1–64.

VAAMONDE, G., A. PATRIARCA, V. FERNANDEZ PINTO, R.. COMERIO and C. Degrossi, 2003. Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus* section *Flavi* from different substrates in Argentina. International Journal of Food Microbiology, 88(1): 79-84.

WEI, D. and S. JONG, 1986. Production of aflatoxins by strains of the *Aspergillus flavus* group maintained in ATCC. Mycopathologia, 93: 19-24.

YIN, Y. N., J. H. YAN and Z. H. MA, 2008. Biological control of aflatoxin contamination of crops. Journal of Zhejiang University Science Biomedicine and Biotechnology, 9(10): 787-792.

www.SID.ir