

بررسی تأثیر جدایه‌های تریکودرما در جلوگیری از رشد قارچ *Aspergillus flavus* و کاهش آفلاتوکسین روی پسته

ساناز چگینی^۱، کیوان بهبودی^{۲*}، محمد جوان نیکخواه^۳ و محسن فرزانه^۴
^۱، ^۲، ^۳، گروه گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج.
^۴، گروه کشاورزی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی، تهران.
 (تاریخ دریافت: ۹۲/۸/۲۰ - تاریخ تصویب: ۹۳/۲/۱)

چکیده

در این پژوهش، تأثیر جدایه‌هایی از قارچ تریکودرما برای کاهش رشد قارچ *Aspergillus flavus* R5 و آفلاتوکسین ناشی از آن در شرایط آزمایشگاه در محیط کشت و مغز پسته مطالعه شد. غربالگری اولیه براساس تأثیر ترکیبات فرار و غیرفرار جدایه‌ها روی رشد استرین *A. flavus* R5 انجام شد. نتایج نشان داد که ترکیبات فرار ۴ جدایه T1، T3، T4 و T17 به ترتیب با ۶۰/۶۶ درصد، ۶۸/۸۸ درصد، ۶۳/۳۳ درصد و ۵۹ درصد و ترکیبات غیرفرار جدایه‌های ذکر شده در غلظت ۵۰ درصد به ترتیب با ۵۰ درصد، ۸۲ درصد، ۷۵ درصد و ۵۸ درصد کاهش، بیشترین تأثیر را در جلوگیری از رشد میسلومی *A. flavus* R5 دارند. در حضور عصاره برون سلولی این ۴ جدایه، میزان آفلاتوکسین و رشد استرین *A. flavus* R5 در محیط مایع کاهش یافت و بیشترین میزان کاهش آفلاتوکسین مربوط به جدایه‌های T3 و T4 به ترتیب با ۸۹/۷۶ درصد و ۸۶/۲۵ درصد بود. تأثیر عصاره این ۴ جدایه در پاک‌سازی آفلاتوکسین اضافه شده به محیط کشت نشان داد که این جدایه‌ها باعث کاهش معنی‌دار آفلاتوکسین شدند و جدایه T3 با ۸۸/۰۳ درصد کاهش آفلاتوکسین، بیشترین تأثیر را از خود نشان داد. بررسی کاربرد عصاره برون سلولی جدایه‌های T1، T3، T4 و T17 به ترتیب سبب ۶۴/۱۱ درصد، ۸۴/۴۰ درصد، ۷۷/۸۸ درصد و ۵۱/۴۴ درصد کاهش میزان آفلاتوکسین تولید شده در پسته شدند. جدایه‌های T1، T3، T4 و T17 به ترتیب متعلق به گونه‌های *T. harzianum*، *T. longibrachiatum* و *T. harzianum* بودند.

واژه های کلیدی: آفلاتوکسین، تجزیه، تریکودرما، پسته، عصاره خارج سلولی

مقدمه

بررسی می‌شود و در بیشتر کشورها حد مجاز آن‌ها بین ۵ تا ۱۵ نانوگرم در گرم مشخص شده است (Aguero et al. 2008). هرچند ممکن است سموم شیمیایی در کاهش رشد قارچ آسپرژیلوس مفید باشند، مشکلات مصرف سموم از قبیل کاهش کیفیت و خواص تغذیه‌ای محصول و اثرات نامطلوب روی سلامت، توجه را به سمت استفاده از روش‌های بیولوژیکی سوق داده است که با کاربرد قارچ‌ها و باکتری‌های مؤثر، امکان‌پذیر است

پسته به‌عنوان محصولی استراتژیک، در بین محصولات صادراتی کشاورزی رتبه نخست را به خود اختصاص داده است و جایگاه ویژه‌ای را در بین تولیدات کشاورزی ایران دارد. مهم‌ترین مشکل صادراتی که در ارتباط با پسته وجود دارد، آلودگی آن به مایکوتوکسین خطرناک آفلاتوکسین است. از آنجا که آفلاتوکسین‌ها سمی و سرطان‌زا هستند، مقدار آن‌ها در مواد غذایی به دقت

جداکردن جدایه های تریکودرما از پسته

تهیه میوه پسته به صورت نمونه برداری حالت N از باغات مناطق مختلف پسته کاری شامل رفسنجان، راور، ساوه و قزوین انجام شد. پسته های رسیده و سالم که پوسته سبز آن ها به پوسته استخوانی نچسبیده بود از باغ های مناطق مذکور جمع آوری شدند و بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شدند و پوشش سبز میوه و پوسته استخوانی و مغز پسته از همدیگر جدا شدند. برای جداکردن جدایه های تریکودرما ابتدا پوسته سبز پسته ها جدا و به صورت قطعاتی کوچک خرد شدند و در ارلن حاوی محلول نمک فیزیولوژیک ۰/۸ درصد استریل شده منتقل شدند و به مدت ۲ ساعت روی دستگاه تکان دهنده با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. سپس، ۱۰۰ میکرولیتر از آن روی محیط کشت انتخابی مک فادن و ساتن (۱ گرم KH₂PO₄، ۰/۵ گرم MgSO₄، ۵ گرم NaCl، ۱۰ گرم Glucose، ۳۰ میلی گرم سولفات استرپتومایسین، ۲۰ گرم آگار، ۰/۲ میلی لیتر فرمالدهید، ۱ لیتر اب مقطر، ۱۷ میلی گرم Rose bengale) پخش شد و در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۶ روز نگهداری شد و پس از گذشت زمان ذکر شده، پرگنه های قارچ تریکودرما رشد کردند. سپس، جدایه های به دست آمده از هریک از نمونه های پسته به محیط آب - آگار ۲ درصد منتقل شدند و با گرفتن نوک ریشه از آن ها و انتقال به محیط کشت PDA خالص شدند. علاوه بر این ۱۵ استرین از گونه های مختلف تریکودرما از کلکسیون قارچ شناسی گروه گیاهپزشکی دانشگاه تهران تهیه شد. به منظور نگهداری از محیط کشت PDA مورب طبق روش Fradkin et al. (1985) استفاده شد.

بررسی قدرت رقابت ساپروفیتی جدایه های تریکودرما با استرین *A. flavus* R5

برای مقایسه قدرت رقابتی ساپروفیتی (جلوگیری از رشد میسلیمی و اسپورزایی قارچ بیماری زا) دیسک های ۵ میلی متری از کشت جوان استرین های تریکودرما و قارچ *A. flavus* R5 در روش آزمون کشت متقابل (Dual Culture) درون تشتک پتری ۹ سانتی متری حاوی محیط PDA قرار داده و تشتک ها به مدت ۴ روز در دمای ۲۷ درجه سلسیوس و در شرایط تاریکی نگهداری

(Harman et al. 1998, Chet and Inbar, 1994) از جمله این عوامل می توان به قارچ هایی مانند *Trichoderma Ampelomyces*، *Gliocladium* کرد که مهم ترین آن ها *Trichoderma* spp. است (Harman et al. 1998). واکنش های بین تریکودرما و بیمارگرهای قارچی به طور خلاصه شامل ۳ مکانیزم میکوپارازیتسم، آنتی بیوز و رقابت است (Howell, 2003). گونه های تریکودرما با تولید آنزیم های تجزیه کننده دیواره سلولی مانند گلوکانازها، پروتئازها و کیتینازها باعث تخریب دیواره سلولی *A. flavus* و در نتیجه، کاهش عملکرد بیمارگر می شوند (El Katatsny et al. 2001). فعالیت آنتاگونیستی گونه های تریکودرما در برابر بیمارگرهای گیاهی مختلف مانند *A. flavus*، *A. niger* و *Penicillium* sp. به اثبات رسیده است (Gheorghie et al. 2008).

تاکنون، برای پاک سازی آفاتوکسین از محیط غذایی نیز میکروارگانیسم های زیادی استفاده شده اند. قارچ هایی از قبیل *A. parasiticus*، *A. niger* و *Trichoderma viride* و *Mucor ambiguous* توانایی چشمگیری در تجزیه آفاتوکسین B1 دارند (Mann and Rehms 1976). از میان عوامل بیوکنترلی مورد استفاده، *T. viride* باعث کاهش قابل توجه رشد *A. flavus* و همچنین، کاهش تولید آفاتوکسین B1 در دانه های برخی غلات شد (Aguero et al. Reddy et al. 2010). براساس بررسی های انجام شده، در ایران تحقیقات کمی در مورد کنترل آفاتوکسین پسته به کمک قارچ تریکودرما روی پسته انجام شده است. بنابراین، هدف از این تحقیق دستیابی به جدایه های تریکودرما بومی از باغات پسته ایران و بررسی مکانیسم تأثیر آن ها در جلوگیری از رشد قارچ و کاهش آفاتوکسین B1 روی پسته است.

مواد و روش ها

تهیه و نگهداری استرین توکسین زای *A. flavus* R5 جدایه توکسین زایی *A. flavus* R5، از کلکسیون قارچ شناسی گروه گیاهپزشکی دانشگاه تهران تهیه شد. جدایه مذکور داخل ویال های حاوی محیط PDA در یخچال نگهداری شد.

۵ مغز پسته قرار داده شد که تقریباً ۱۰ گرم وزن داشتند) منتقل شدند. بلافاصله به میزان ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور قارچ *A. flavus* R5 با غلظت 5×10^4 محل زخم هر پسته مایه‌زنی و به مدت ۶ روز در انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی نگهداری شد. پس از گذشت مدت زمان ذکر شده، تعداد اسپور قارچ در گرم پسته محاسبه و میزان آفلاتوکسین تولیدشده در نمونه‌ها استخراج و اندازه‌گیری شد.

تأثیر عصاره خارج سلولی جدایه‌های تریکودرما در جلوگیری از رشد قارچ و کاهش آفلاتوکسین در محیط مایع

عصاره برون سلولی تریکودرما مطابق بند ۴ تهیه شد. ابتدا ۵ میلی‌لیتر از عصاره خارج سلولی تریکودرما به ارلن‌های ۲۵ میلی‌لیتری حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت PDB ریخته شد. سپس، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیونی با غلظت 5×10^4 اسپور قارچ به هر ارلن اضافه شد؛ پس از ۷ روز نگهداری در دستگاه شیکر انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس و سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه، توده‌های میسلیمی رشد کرده به کمک کاغذ واتمن شماره ۴ از محیط کشت جدا و در آن با دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۱ ساعت قرار داده شدند. سپس، وزن خشک میسلیوم محاسبه و میزان آفلاتوکسین تولیدشده طبق روش (Teniola et al. (2005) ارزیابی شد.

تأثیر عصاره خارج سلولی تریکودرما در کاهش میزان آفلاتوکسین

این آزمایش طبق روش (Alberts et al. (2006) انجام شد. ابتدا، عصاره خارج سلولی تریکودرما تهیه شد. سپس، داخل لوله‌های ۱/۵ میلی‌لیتری، ۱ میلی‌لیتر از این عصاره خارج سلولی ریخته شد و بعد از آن به هر کدام از این لوله‌ها، ۲۰ میکرولیتر آفلاتوکسین B1، استاندارد آفلاتوکسین B1 از شرکت آگروس ارگانیکس آمریکا، ACROS ORGANICS Company, (USA) اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شد. پس از گذشت زمان ذکر شده، آفلاتوکسین موجود در محیط استخراج و مقدار آن تعیین شد.

شدند. تیمار شاهد فقط حاوی دیسک قارچ *A. flavus* بود. آزمون در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار انجام شد. میزان بازدارندگی از رشد شعاعی بیمارگر در مقایسه با شاهد محاسبه شد (Rama Bahadra Rajo et al. 2000).

تأثیر متابولیت‌های غیرفرار و فرار جدایه‌های تریکودرما بر رشد میسلیمی *A. flavus* R5
تأثیر متابولیت‌های فرار جدایه‌های تریکودرما بر رشد میسلیمی *A. flavus* R5 با استفاده از روش Fiddaman and Rossal (1993) انجام شد. تیمار شاهد فقط حاوی قارچ *A. flavus* R5 بود.

به منظور بررسی تأثیر متابولیت‌های غیرفرار جدایه‌های تریکودرما بر رشد میسلیمی *A. flavus* R5 عصاره خارج سلولی تریکودرما به روش Berg and Ballin (1995) تهیه شد. به‌طور خلاصه از کشت ۷ روزه تریکودرما در محیط مایع PDB، عصاره خارج سلولی سترون به کمک دستگاه پمپ خلا و صافی میکروبیولوژیک با قطر روزنه ۰/۲۲ میکرومتر، تهیه شد. سپس، غلظت‌های ۱۰ درصد، ۲۵ درصد و ۵۰ درصد از عصاره برون سلولی جدایه‌های تریکودرما در محیط کشت PDA تهیه شد. درصد بازدارندگی از رشد جدایه‌های تریکودرما از رابطه زیر محاسبه شد.

$$IG = [(C-T)/C] \times 100$$

IG=درصد بازدارندگی از رشد میسلیمی *A. flavus* R5
C=قطر رشد میسلیوم *A. flavus* R5 در تشتک پتری شاهد

T=قطر رشد میسلیوم *A. flavus* R5 در هر تیمار

تأثیر عصاره خارج سلولی جدایه‌های تریکودرما در کاهش میزان آفلاتوکسین روی مغز پسته

به منظور انجام این آزمایش ابتدا با استفاده از اسکالپل، روی مغز پسته‌ها در طول درز پوسته استخوانی و با کمک سوزن استریل زخمی به عمق ۲ و عرض ۱ میلی‌متر ایجاد شد. سپس، به‌طور جداگانه از هر جدایه تریکودرما عصاره خارج سلولی به میزان ۲۰۰ ml/kg تهیه شد و پسته‌های زخم‌شده به مدت ۲۰ دقیقه درون هر یک از عصاره‌ها به روش غوطه‌ور شدن تیمار و به درون تشتک‌های پتری ۹ سانتی‌متری (در هر تشتک پتری

پس از تجزیه واریانس، میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۱ درصد یا ۵ درصد مقایسه شدند.

نتایج و بحث

بررسی قدرت رقابتی ساپروفیتی جدایه‌های تریکودرما با *A. flavus R5*

نتایج توانایی آنتاگونیستی ۸ جدایه از قارچ تریکودرما جدا شده از پوسته خارجی پسته و ۱۵ استرین دریافت شده از کلکسیون قارچ‌شناسی گروه گیاهپزشکی دانشگاه تهران در مقابل *A. flavus R5* به روش کشت متقابل در تشتک پتری نشان داد که ۱۳ جدایه از ۲۳ جدایه مورد بررسی، بازدارندگی بیش از ۵۰ درصد را سبب شدند که برای آزمایش‌های بعدی استفاده شدند (داده‌ها نشان داده نشده است). این بازدارندگی از رشد می‌تواند بر اثر تولید آنزیم‌های خارج سلولی و همچنین، بر اثر پدیده مایکوپارازیتسم باشد. مایکوپارازیتسم، یکی از مکانیزم‌های اصلی بیوکنترلی قارچ تریکودرما است و این فرآیند شامل چندین مرحله است که به ترتیب عبارتند از تشخیص میزبان، رشد به طرف هیف‌های آن، تماس، پیچش، نفوذ و سرانجام لیز کردن و مرگ قارچ هدف است (Woo et al. 2006).

تأثیر متابولیت‌های فرار و غیرفرار جدایه‌های تریکودرما بر تر روی رشد میسلیمی *A. flavus R5* مقایسه میانگین داده‌ها نشان می‌دهد که همه جدایه‌ها تفاوت معنی‌داری با شاهد دارند به طوری که، بالاترین درصد کاهش رشد میسلیمی اسپریلوس مربوط به جدایه T3 با ۶۸٫۸۸ درصد کاهش بود و پس از آن جدایه‌های T1، T4 و T17 به ترتیب با ۶۰٫۶۶ درصد، ۶۳٫۳۳ درصد و ۵۹ درصد بازدارندگی، بیشترین بازدارندگی از رشد میسلیمی *A. flavus R5* را نشان دادند (جدول ۱).

از نظر تأثیر ترشحات مایع خارج سلولی جدایه‌های تریکودرما در جلوگیری از رشد میسلیم قارچ *A. flavus* در سطح ۱ درصد بین تمام جدایه‌ها در هر ۳ غلظت تفاوت معنی‌داری مشاهده شد. به طور کلی با افزایش غلظت از ۱۰ به ۲۵ و ۵۰ درصد، قدرت بازدارندگی عصاره

استخراج و ردیابی آفاتوکسین

برای استخراج آفاتوکسین B1 از میسلیم، وزن مشخصی از میسلیم به کمک ازت مایع منجمد و در هاون پودر شد. محتوای آفاتوکسین پودر حاصل در حضور کلروفورم با استفاده از قیف دکانتور ۳ مرتبه استخراج شد. استخراج آفاتوکسین‌های موجود در محیط کشت مایع نیز ۳ مرتبه و طبق روش Teniola et al. (2005) با استفاده از حلال کلروفورم انجام شد. سپس، کلروفورم در دمای ۶۰ درجه سلسیوس با استفاده از گاز نیتروژن یا حمام آبی تبخیر شد. نمونه‌های حاصل حداکثر به مدت ۲ هفته تا انجام آنالیز کروماتوگرافی در دمای ۴ درجه سلسیوس درون یخچال نگهداری شدند.

برای انجام کروماتوگرافی و اندازه‌گیری آفاتوکسین از دستگاه کروماتوگرافی لایه نازک با کارایی بالا^۱ (HPTLC) استفاده شد. ابتدا، هر نمونه در ۱ میلی‌لیتر کلروفورم به کمک دستگاه تولیدکننده امواج ماورای صوت، پاور سونیک^۲، کاملاً حل شد. سپس، نمونه‌ها روی صفحه سلیکاژلی TLC Silica gel 60 (F254, Merck, Darmstadt, Germany) به فاصله مناسب لکه‌گذاری شدند. سپس، صفحات لکه‌گذاری شده در حلال کلروفورم - استون (به نسبت ۹ به ۱) قرار داده شدند و عمل جدا کردن آفاتوکسین انجام شد. پس از جدا کردن، صفحات مذکور درون قسمت آنالیز دستگاه HPTLC قرار گرفتند و با استفاده از نرم‌افزار (CAMAG VideoScan TLC/HPTLC Evaluation Software V. 1.01) به صورت کمی و کیفی در طول موج ۳۶۵ نانومتر ارزیابی شدند.

تجزیه و تحلیل آماری

تمام آزمایش‌ها به صورت طرح کاملاً تصادفی و با ۴ تکرار انجام شد. برای تجزیه داده‌ها از ۲ نرم‌افزار به تفکیک کارهای مورد نیاز استفاده شد. در ابتدا، نرمال بودن داده‌ها با نرم‌افزار Mini-tab مشخص شد. برای تجزیه واریانس از نرم‌افزار SAS و به روش GLM استفاده شد.

1. High performance tin layer chromatography
2. Power sonic

و T17 به ترتیب با ۵۱ درصد، ۸۲ درصد، ۷۵ درصد و ۵۹ درصد بازدارندگی از رشد میسلیومی *A. flavus* R5. بیشترین تأثیر را داشتند.

برون سلولی جدایه‌های تریکودرما در محیط کشت جامد افزایش یافت و تأثیر غلظت ۵۰ درصد بیش از سایر غلظت‌ها است (داده‌ها نشان داده نشده است). غلظت ۵۰ درصد از عصارهٔ خارج سلولی جدایه‌های T1، T3، T4

جدول ۱. تأثیر ترکیبات فرار و غیرفرار جدایه‌های تریکودرما در جلوگیری از رشد میسلیومی *A. flavus* R5

درصد بازدارندگی		جدایه‌های تریکودرما	
غلظت ۵۰ درصد عصاره خارج سلولی **۵۰ cd*	ترکیبات فرار *۶۰/۶۶ c*		
		T1	
۴۶ cde	۳۵/۱۸ d	T2	
۸۲ a	۶۸/۸۸ a	T3	
۷۵ ab	۶۲/۳۳ b	T4	
۴۱ cdefg	۲۷/۷۷ f	T5	
۴۳ cdefg	۳۲/۲۲ e	T6	
۴۳/۳۳ cdefg	۳۲/۴۴ de	T8	
۴۶ cdef	۳۶ d	T9	
۴۵ cdef	۳۳/۳۳ e	T12	
۲۰ mnopq	۲۲/۲۲ g	T13	
۵۸ cd	۵۹ c	T17	
۳۲/۲۲ ghijklm	۳۵ de	T20	
۴۱ defgh	۳۳/۳۳ ef	T21	
۰ r	۰ h	شاهد	

* حروف غیرمتشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد $p \leq$ است.

** اعداد میانگین ۳ تکرار هستند.

داشته باشند. تأثیر متابولیت‌های غیرفرار تریکودرما را نیز Calistru *et al.* (1997) گزارش کرده است.

تأثیر عصاره I خارج سلولی جدایه‌های برتر تریکودرما در کاهش میزان آفلاتوکسین مغز پسته
توانایی آنتاگونیستی ۴ جدایه برتر تریکودرما در کاهش میزان آفلاتوکسین تولیدشده با *A. flavus* R5 روی مغز پسته مطالعه شد. براساس مقایسهٔ میانگین داده‌ها در سطح ۱ درصد جدایه‌ها نسبت به شاهد دارای تفاوت معنی‌داری بودند و هر ۴ جدایهٔ تریکودرما توانایی کاهش آفلاتوکسین را داشتند. جدایهٔ T3 نسبت به سایر جدایه‌ها، با ۸۴/۴۰ درصد کاهش آفلاتوکسین مؤثرترین بود (جدول ۲). علاوه بر این غوطه‌ورکردن پسته‌ها در عصاره‌های خارج سلولی جدایه‌های تریکودرما در کاهش جمعیت قارچ *A. flavus* (تعداد اسپور در گرم مغز پسته)

یکی از مکانیزم‌های قارچ تریکودرما در برابر بیمارگرها، آنتی‌بیوز است که با تولید متابولیت‌های ضد میکروبی فرار و غیرفرار خارج سلولی از فعالیت قارچ دیگر بازدارندگی می‌شود. مهم‌ترین ترکیب شناخته‌شده در پدیدهٔ آنتی‌بیوز، آنتی‌بیوتیک‌ها هستند (Ghisalberti *et al.* 1991).

قارچ تریکودرما مجموعه‌ای از متابولیت‌های ثانویه را تولید می‌کند که این متابولیت‌ها شامل ترکیبات طبیعی مختلف است که دارای فعالیت‌های محافظتی علیه بیمارگرهای گیاهی است (Demain and Fang 2000). قبلاً، Agüero *et al.* (2008) تأثیر متابولیت‌های فرار تریکودرما در کاهش رشد *A. flavus* روی دانه‌های ذرت را گزارش کرده بود. (Claydon *et al.* 1987) بیان کردند که آلکیل پیرون‌ها می‌توانند به‌عنوان مواد فرار در مکانیسم آنتاگونیسم بعضی از جدایه‌های تریکودرما نقش

نقش معنی داری نشان داد. بیشترین کاهش جمعیت مربوط به جدایه T3 است که میزان اسپور تولیدی قارچ روی پسته ۸۰/۴۸ درصد کاهش پیدا کرد (جدول ۲).

جدول ۲. تأثیر جدایه های تریکودرما در کاهش رشد قارچ و میزان آفاتوکسین *A. flavus* R5 بر مغز پسته

تیمارها	میانگین میزان تولید آفاتوکسین (ppb)	تعداد اسپور قارچ در گرم مغز پسته
T1	۶۱۰/۳۲	۵/۴ × ۱۰۶ c*
T3	۲۶۵/۲۹	۲/۱ × ۱۰۶ e
T4	۳۷۶/۰۳	۳/۷ × ۱۰۶ d
T17	۸۲۵/۷۵	۶/۵ × ۱۰۶ b
شاهد پسته + <i>A. flavus</i>	۱۷۰۰/۶۳	۱۲/۳ × ۱۰۶ a
شاهد پسته سالم	۰	۰ e

* حروف غیرمتشابه بیانگر اختلاف معنی دار در سطح ۱ درصد $p \leq$ است.
** اعداد میانگین ۳ تکرار هستند.

میزان آفاتوکسین تولید شده در محیط کشت مایع نسبت به شاهد تفاوت معنی داری در سطح ۱ درصد دارند. عصاره خارج سلولی جدایه T3 با قدرت بازداری ۷۹ درصد از رشد میسلومی قارچ، بیشترین تأثیر را نشان داد. به طور کلی با به کار بردن عصاره برون سلولی جدایه های تریکودرما میزان آفاتوکسین کاهش یافت. جدایه T3 با ۸۹/۷۶ درصد کاهش آفاتوکسین، کارآمدترین جدایه بود و جدایه T4 با ۸۶/۲۵ درصد کنترل، در مرتبه بعدی قرار گرفت (جدول ۳).

این مقدار کاهش در میزان آفاتوکسین درون سلولی ممکن است بر اثر تولید ترکیباتی باشد که در الگوی بیان ژن های درگیر در سنتز آفاتوکسین دخالت داشته اند و اختلال ایجاد کنند.

طبق تحقیقات Reddy et al. (2010) ترشحات مایع خارج سلولی *T. virens* به طور مؤثری از رشد قارچ *A. flavus* (۸۰ درصد) و تولید آفاتوکسین B1 (۷۲/۲ درصد) جلوگیری کرد. گزارش شده است که تولید آفاتوکسین با عواملی مانند قارچ های جنس *Trichoderma*، باکتری های لاکتیک اسید و *Bacillus subtilis* ممانعت می شود که این ممانعت ممکن است بر اثر فاکتورهای مختلفی مانند رقابت برای مکان و مواد غذایی و تولید متابولیت های ضد آفاتوکسین باشد (Reddy et al. 2009).

(Reddy et al. 2009) بیان کردند که از میان عوامل بیوکنترلی مورد استفاده *T. viride* باعث ۶۵ درصد کاهش رشد *A. flavus* و ۳۹ درصد کاهش در تولید آفاتوکسین B1 در دانه های سورگوم می شود. همچنین، *T. virens* روی دانه های برنج کاهش ۸۰ درصد از رشد *A. flavus* و ۷۲/۲ درصد از تولید آفاتوکسین B1 را سبب می شود (Reddy et al. 2009, Reddy et al. 2010).

Choudhary در سال ۱۹۹۲ بیان کرد که *T. viride* باعث ۷۳/۳ درصد کاهش در تولید آفاتوکسین B1 و ۱۰۰ درصد کاهش در تولید آفاتوکسین G1 در دانه های ذرت آلوده می شود.

همچنین، مطالعه های میکروسکوپ الکترونی نشان داد که تریکودرما با تولید آنزیم های سلولیتیک، پکتینولیتیک، پروتئولیتیک و آمیلولیتیک باعث تغییر در مورفولوژی هیف های اسپریلوس می شود (Calisstru et al. 1997).

تأثیر عصاره خارج سلولی تریکودرما در جلوگیری از رشد *A. flavus* R5 و کاهش آفاتوکسین در محیط کشت مایع مقایسه میانگین داده ها نشان می دهد که هر ۴ جدایه تریکودرما هم از نظر وزن خشک میسلومی و هم از نظر

جدول ۳. تأثیر جدایه‌های تریکودرما در جلوگیری از رشد استرین *A. flavus* R5 در محیط کشت مایع

تیمارها	میانگین وزن خشک توده میسلیمی تولیدشده (میلی گرم)	میانگین میزان تولید آفلاتوکسین (ppb)
T1	۷۱/۸۵ d*	۱۷۴/۴۱
T3	۶۹/۶۰ d	۷۵/۸۷
T4	۷۷/۸۵ c	۱۳۸/۷۳
T17	۹۲/۰۰ b	۳۸۰/۰۲
شاهد	۱۲۰/۰۰ a	۱۷۹۱/۴۵

* حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد $p \leq$ است.

** اعداد میانگین سه تکرار هستند.

تأثیر عصاره خارج سلولی تریکودرما در کاهش میزان

AFB1 موجود در محیط

براساس نتایج به‌دست‌آمده و مقایسه میانگین‌ها، همه تیمارها با شاهد دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد هستند. از بین تیمارها، جدایه T3 فعالیت پاک‌سازی بسیار قوی از خود نشان داد به طوری که،

۸۸/۰۳ درصد آفلاتوکسین اولیه موجود در محیط کشت را پس از ۷۲ ساعت پاک‌سازی کرد و جدایه T17 با ۵۵/۲۲ درصد کاهش آفلاتوکسین، کمترین توانایی را در حذف آفلاتوکسین موجود در محیط نشان داد (جدول ۴).

جدول ۴. تأثیر عصاره خارج سلولی جدایه‌های تریکودرما در کاهش میزان AFB1 موجود در محیط

تیمارها	میانگین میزان تولید آفلاتوکسین (ppb)	درصد کاهش آفلاتوکسین
T1	۱۴۷/۲۵	۶۷/۷۸ c*
T3	۵۴/۸۳	۸۸/۰۳ a
T4	۹۲/۸۶	۷۹/۷۳ b
T17	۲۰۵/۱۹	۵۵/۲۲ d
شاهد	۴۵۸/۳۳	۰ e

* حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد $p \leq$ است.

** اعداد میانگین ۳ تکرار هستند.

می‌شود که نشان از فعالیت آنزیمی عصاره برون سلولی قارچ تریکودرما در پاک‌سازی و تخریب آفلاتوکسین است. براساس بررسی‌های انجام‌شده، ترشحات برون سلولی برخی از گونه‌های تریکودرما در تجزیه آفلاتوکسین B1 مؤثر هستند و آنزیم‌های پراکسیداز در عمل سم‌زدایی آفلاتوکسین دخالت دارند. کومارین اساس ساختار مولکولی تمام آفلاتوکسین‌هاست؛ بنابراین، مشخص شده است میکروارگانیزم‌هایی که می‌توانند از کومارین به‌عنوان منبع کربن استفاده کنند می‌توانند آفلاتوکسین‌ها را استفاده و آن‌ها را نیز تجزیه کنند. فزون بر این، حلقه‌های لاکتون و فورانون نیز از ساختار آفلاتوکسین B1 هستند، لذا، میکروارگانیزم‌های تولیدکننده لاکتوناها و تجزیه‌کننده فورانون، می‌توانند آفلاتوکسین B1 را نیز تجزیه کنند (Reddey et al. 2010).

مکانیسم‌های کاهش و غیرفعال کردن زیستی توکسین‌ها که تاکنون شناخته شده است شامل تجزیه، هضم و جذب سطحی است (Laciakova et al. 2008). طبق تحقیقات Reddey et al. (2010) گونه‌های تریکودرما در تجزیه آفلاتوکسین B1 نقش دارند. در این تحقیق پاک‌سازی زیستی آفلاتوکسین در هر ۴ جدایه مشاهده می‌شود، اما میزان کارایی این مکانیسم در هر ۴ جدایه یکسان نیست. جدایه T3 فعالیت پاک‌سازی بسیار قوی از خود نشان داد در حالی که، جدایه T17 کمترین توانایی را در حذف آفلاتوکسین موجود در محیط نشان داد. با این اوصاف به نظر می‌رسد یکی از مکانیسم‌های اصلی در کاهش آفلاتوکسین با جدایه T3، مکانیسم پاک‌سازی زیستی آفلاتوکسین و تجزیه آفلاتوکسین است. در این تحقیق معلوم شد عصاره برون سلولی جدایه T3 باعث پاک‌سازی چشمگیر آفلاتوکسین

نتیجه گیری

می تواند نقش مهمی در طراحی استراتژی کنترل آفاتوکسین براساس کاربرد منفرد یا مخلوط استرین ها و یا کاربرد متابولیت های خالص شده آن ها در مراحل مختلف باغ، انبار و حمل و نقل داشته باشد و امکان طراحی آسان، کارآمد و مقرون به صرفه، سم زدایی آفاتوکسین موجود در محیط های مختلف را نیز فراهم می سازد. در نهایت، دستیابی به ترکیبات ضد قارچی مؤثر در جلوگیری از رشد قارچ و کاهش آفاتوکسین می تواند مرحله مقدماتی برای سنتز و ساخت سموم ارگانیک و طبیعی باشد. همچنین، باید به این نکته نیز توجه داشت که سلول های قارچی از نظر داشتن اندامک های مشابه و غشای فسفولیپیدی شباهت زیادی به سلول پستانداران دارند، جز اینکه قارچ ها به جای کلسترول حاوی ارگسترول هستند؛ بنابراین، یک وظیفه بسیار مشکلی به وجود می آید که جدایه هایی غربال شوند و یا ترکیباتی از آن ها استخراج و مصرف شوند که برای قارچ ها سمی باشند، اما برای سلول های پستانداران غیر سمی باشند. بنابراین، باید به تحقیق روی این جدایه ها و توانایی آن ها در تولید ترکیبات سمی نیز توجه کرد.

دستاوردی که از این پژوهش می توان به آن اشاره کرد دست یافتن به جدایه هایی از تریکودرما است که نقش مؤثری در کاهش رشد قارچ و میزان آفاتوکسین دارند. پتانسیل خوبی که این جدایه ها در کنترل بیولوژیکی قارچ *A. flavus* و مقدار آفاتوکسین نشان دادند امکان کاربرد تجاری آن ها را برای کاهش میزان آلودگی محصولات کشاورزی به آفاتوکسین و تأمین امنیت غذایی فراهم می کند. از طرفی پاک سازی زیستی و تجزیه آفاتوکسین با جدایه T3 کاندیدی توانمند را معرفی می کند. جدایه T3 به طور مؤثری از رشد قارچ *A. flavus* ممانعت کرد و احتمالاً پتانسیل لازم برای کاهش زادمایه اولیه قارچ در اندام های گیاهی و خاک مزارع و باغات را دارد و در پیشگیری آلودگی محصولات کشاورزی به آفاتوکسین به ویژه در مرحله قبل از برداشت سودمند است.

همچنین، مکانیسم های عمل متعددی با میزان کارایی های مختلف، در جلوگیری از رشد قارچ و کاهش آفاتوکسین آن مؤثر است؛ شناخت مکانیسم های عمل این جدایه های انتخاب شده در کاهش آفاتوکسین

REFERENCES

- Aguero LEM, Alvarado R, Martinez A, Dorta B** (2008) Inhibition of *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin B1 production in stored maize grains exposed to volatile compounds of *Trichoderma harzianum* RIFAL. *Interciencia*. marzo. Anol. Caracas. 33: 219-222.
- Alberts JF, Gelderblom WCA, Botha A, Van Zyl WH** (2009) Degradation of aflatoxin B1 by fungal laccase enzymes. *Int. J. Food Microbiol.* 135: 47-52.
- Alberts JF, Engelbrecht Y, Steyn PS, Holzappel WH, Van Zyl WH** (2006) Biological degradation of aflatoxin B1 by *Rhodococcus erythropolis* cultures. *Int. J. Food Microbiol.* 109: 121-126.
- Berg G, Balin G** (1995) Bacterial antagonists to *Verticillium dahlia*. *J. Phytopathol.* 141: 99-110.
- Calistru C, McLean M, Berjak P** (1997) In vitro studies in the potential for biological control of *Aspergillus flavus* and *Fusarium moniliforme* by *Trichoderma* species. *Mycopathol.* 137: 115-124.
- Chet I, Inbar J** (1994) Biological control of fungal pathogens. *Appl. Biochemistry and Biotechnol.* 48: 37-43.
- Choudary KA, Redday KRN, Redday MS** (2007) Antifungal activity and generic variability of *Trichoderma harzianum* isolates. *J. Mycol. Plant Pathol.* 37(2): 295-300.
- Choudary KA** (1992) Influence of microbial co-inhibitors on aflatoxin synthesis of *Aspergillus flavus* on maize kernels. *Lett. Appl. Microbiol.* 14: 143-147.
- Claydon N, Allan M, Hanson IR, Avont AG** (1987) Antifungal alkyl pyrones of *Trichoderma harzianum*. *Trans. Br. Mycol.* 88: 503-513.
- Demain AL, Fang A** (2000) The natural functions of secondary metabolites. *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnol.* 69: 1-39.
- El-Katatny MH, Gudelj M, Robra KH** (2001) Characterization of chitinase and endo glucanases from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 137-143.
- Fiddaman PJ, Rossal S** (1993) The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. *J. Appl. Bacteriol.* 74:119-126.

- Gheorghe A, Jeca L, Rosu A, Popea F, Voicu A, Nita A** (2008) Antagonism of *Trichoderma* sp. vs phytopathogen microorganisms. Proceedings of the International Conference BIOATLAS Transilvania University of Brasov, Romania.
- Ghisalberti EL, Sivasithamparam K** (1991) Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. Soil Biol. & Biochemistry. 23: 1011-1020.
- Ghisalberti EL, Narbey MJ, Dewan MM, Sivasithamparam K** (1990) Variability among strains of *Trichoderma harzianum* in their ability to reduce take-all and to produce pyrones. Plant and Soil. 121: 287-291.
- Harman GE** (2000) Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. Plant Diseases. 84: 377-393.
- Harman GE** (2006) Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. Phytopathol. 96(2): 190-194.
- Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M** (2004) *Trichoderma* species-opportunistic avirulent plant symbionts. Nat. Rev. Microbiol. 2: 43-56.
- Harman GE, Kubicek CP** (1998) *Trichoderma* and *Gliocladium*. Taylor & Francis, London. 278 pages.
- Howell CR** (2003) Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. Plant Diseases. 87: 4-10.
- Howell CR** (2006) Understanding the mechanisms employed by *Trichoderma virens* to effect biological control of cotton diseases. Phytopathol. 96: 178-180.
- Howell CR, Puckhaber LS** (2005) A study of the characteristics of “P,” and “Q,” strains of *Trichoderma virens* to account for differences in biological control efficacy cotton seeding diseases. Biological Control. 33: 217-222.
- Howell CR, Hanson EL, Stipanovic RD, Puckhaber LS** (2000) Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. Phytopathol. 90: 248-252.
- Kubicek CP, Mach RL, Peterbauer CK, Lorito M** (2001) *Trichoderma*: from genes to biocontrol. J. Plant Pathol. 83: 11-23.
- Mann R, Rehm HJ** (1976) Degradation products from aflatoxin by *Corynebacterium rubrum*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride* and *Mucor ambrigus*. E. J. Appl. Microbiol. 2: 297-306.
- Rama Bhadra Raju M, Krishna Murthy KVM** (2000) Effect of *Trichoderma* spp. in the management of collar rot of groundnut caused by *Aspergillus niger* Van Tieghem. Indian J. Plant Prot. 28: 197-199.
- Reddey KRN, Raghavender CR, Reddy BN, s alleh B** (2010) Biological Control of *Aspergillus flavus* growth and subsequent aflatoxin B1 production in sorghum grains. Africa. J. biotechnol. 9 (27): 4247-4250.
- Reddey KRN, Reddy CS, Muralidharan K** (2009) Aflatoxin B1 producing potential of *Aspergillus flavus* strains isolated from stored rice grains. Africa. J. biotechnol. 8 (14): 3303-3308.
- Reddey SV, Reddy BN, Waliyar F** (2008) Properties of aflatoxin and it producing fungi. Focusion from: www. Aflatoxin. Info/aflatoxin. Asp.
- Teniola OD, Addo PA, Brost IM, Farber P, Jany KD, Alberts JF, Van Zyl WH, Steyn PS, Holzapfel WH** (2005) Degradation of aflatoxin B1 by cell-free extracts of *Rhodococcus erythropolis* and *Mycobacterium fluoranthenorans* sp. nov. DSM 44556(T). Int. J. Food Microbiol. 105: 111-117.
- Woo SL, Donz elli B, Scala F, Mach R, Harman GE, Kubicek CP, Del Sorbo G, Lori to M** (1999) Disruption of the ech42 gene effect biocontrol activity in *Trichoderma harzianum* P1. Molecular Plant-Microbe Interaction. 12: 419-429.
- Woo SL, Formisano F, Fogliano V, Cosenza C, Mauro A, Turra D, Soriente I, Ferraioli S, Scala F, Lorito M** (2004) Factors that contribute to the mycoparasitism stimulus in *Trichoderma atroviride* P1. J. Zhejiang University Science. 30: 421.
- Woo SL, Scala F, Ruocco M, Lorito M** (2006) The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., Phytopathol. 96: 181-185.