Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 12, No. 2, June. July. 2016, p. 318- 329

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۲، شماره ۲، خرداد-تیر ۱۳۹۵ ص.۳۲۹-۳۱۸

بررسی حضور قارچ‌های مولد آفلاتوکسین در پسته منطقه خراسان (شهرستان‌های گناباد و فیض‌آباد) بااستفاده از روش مولکولی

نسیم پورابراهیم[۱]، مسعود یاورمنش[۲*]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۰/۰۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۱/۱۷

چکیده

هدف از این پژوهش، بررسی رابطه احتمالی بین حضور کپک آسپرژیلوس و ژن‌های مولد آفلاتوکسین با شمارش کپک و مخمر، شمارش کلی میکرارگانیسم‌های مزوفیل و درصد رطوبت در پسته خام بود. بدین‌منظور نمونه‌برداری از مناطق مختلف کشت پسته درشهرستان‌های گناباد و فیض‌آباد انجام شد. در این تحقیق، ۳۰ جدایه قارچی متعلق به جنس آسپرژیلوس شناسایی و به کمک روش‌های مبتنی برکشت و با استفاده از محیط کشت پوتیتو دکستروز آگار خالص‌سازی شدند. شناسایی جنس آسپرژیلوس با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز توسط جفت آغازگر اختصاصی Asp1/Asp2 جهت تکثیر ناحیه 18S rRNA انجام گردید. همچنین ردیابی ژن‌های دخیل در مسیر تولید آفلاتوکسین توسط ۳ جفت آغازگر APA-450/APA-1482، *ver1/ver2* و OMT-208/OMT-1232 صورت گرفت. از میان ۳۰ جدایه قارچی، ۱۲ نمونه حاوی ژن *omtA* و ۴ نمونه حاوی ژن *ver1* بودند. در هیچ‌یک از جدایه‌های قارچی ژن تنظیمی *aflR* مشاهده نشد. نتایج بدست آمده نشان داد که هرچند بعضی از جدایه‌ها یک یا دو ژن ساختاری دخیل در مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین را دارند ولی با توجه به عدم حضور ژن تنظیمی *aflR*، بصورت بالقوه قادر به تولید آفلاتوکسین نمی‌باشند. جهت بررسی رابطه احتمالی بین حضور کپک آسپرژیلوس و ژن‌های مولد آفلاتوکسین در پسته، ضریب همبستگی محاسبه گردید. نتایج بررسی‌های آماری نشان داد که همبستگی بالایی بین حضور کپک آسپرژیلوس و ژن‌های *ver1* و *omtA* بر اساس دامنه رطوبت وجود دارد ($p<0/05$)، در حالی‌که بین حضور کپک آسپرژیلوس و ژن‌های مذکور در دامنه‌های مختلف شمارش کپک و مخمر و همچنین شمارش کلی میکروارگانیسم‌های مزوفیل، رابطه معنی‌داری وجود ندارد.

واژه‌های کلیدی: آسپرژیلوس، آفلاتوکسین، پسته، ژن‌های مولد آفلاتوکسین، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

مقدمه

پسته یکی از محبوب‌ترین مغزهای درختی است. در میان گونه‌های مختلف جنس پیستاسا[۵]، تنها میوه‌های مربوط به گونه پیستاساورئه‌آ[۶] با توجه به اندازه مطلوبی که دارند، بعنوان مغز خوراکی مورد پسند مصرف‌کنندگان می‌باشد (Shokraii and Esen, 1988). کشت پسته در مناطق کویری و خشک ایران انجام می‌شود که در این مناطق میزان بارندگی بسیار ناچیز و از نظر اقتصادی برای تولید سایر محصولات کشاورزی مطلوب نمی‌باشد. در سال‌های اخیر درآمد ارزی حاصل از صادرات پسته پس از نفت قرار گرفته است و حدود ۱۰ درصد از ارزش صادرات غیر نفتی مربوط به این محصول بوده است (Sedaghat, 2011). براساس آخرین آمار منتشرشده توسط سازمان خواروبار و کشاورزی جهانی (فائو[۷])، ایران با ۴۷۲۰۹۷ تن، ایالت متحده آمریکا با ۲۳۱۰۰۰ تن، ترکیه با ۱۵۰۰۰۰ تن، چین با ۷۴۰۰۰ تن و سوریه با ۵۷۱۹۵ تن پنج تولیدکننده بزرگ پسته در سال ۲۰۱۲ بوده‌اند (FAOSTAT, 2012).

آلودگی پسته به گونه‌های قارچ آسپرژیلوس و مایکوتوکسین‌های آن، مهمترین معضل در زمینه مصرف و صادرات این محصول محسوب می‌شود (kabirian *et al*., 2011). آفلاتوکسین‌ها ۸ که گروه بزرگی از مایکوتوکسین‌ها را تشکیل می‌دهند، متابولیت‌های ثانویه با اثرات سمی، سرطان‌زایی و جهش‌زایی هستند که بطور عمده

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قوچان، قوچان، ایران
۲- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
(* - نویسنده مسئول: Email: yavarmanesh@um.ac.ir)

5 Pistacia
6 *Pistacia vera L.*
7 FAO
8 Aflatoxin

توسط گونه‌های *Aspergillus flavus* و *Aspergillus parasiticus* تولید می‌شوند (Calvo *et al*., 2002). همچنین برخی از گونه‌های دیگر آسپرژیلوس از جمله *Aspergillus nomius*، *Aspergillus pseudotamarii*، *Aspergillus bombycis* و *Aspergillus ochraceoroseus* مولد آفلاتوکسین گزارش شده‌اند (Wen *et al*., 2004). آفلاتوکسین‌ها در سطح وسیعی از مواد غذایی و محصولات کشاورزی شامل ذرت، بادام زمینی، مغزهای درختی و دانه‌های روغنی مشاهده می‌شوند (Razzaghi *et al*. 2011).

تولید مایکوتوکسین‌ها از جمله آفلاتوکسین‌ها توسط عوامل مختلف نظیر ویژگی‌های ژنتیکی قارچ‌های مولد و محیط فیزیکوشیمیایی که در آن رشد می‌کنند تحت تاثیر قرار می‌گیرد (علامه و رزاقی، ۱۳۸۰). در میان عوامل محیطی مختلف، درجه حرارت و رطوبت نسبی مهمترین فاکتورهای موثر در تولید آفلاتوکسین می‌باشند. تولید بهینه آفلاتوکسین در دامنه دمایی ۲۸ تا ۳۵ درجه سانتی‌گراد است (OBrian *et al*., 2007). مطالعات انجام شده نشان داده که درجه حرارت و رطوبت نسبی بهینه برای تولید آفلاتوکسین در پسته و فندق، به‌ترتیب ۳۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۹۹-۹۷٪ می‌باشند (Diener and Davis 1967; Simsek *et al*. 2002).

بسیاری از کشورها مقررات ویژه‌ای برای تولید، مصرف و واردات مواد غذایی و دارویی در جهت مقابله با خطرات جدی ناشی از مایکوتوکسین‌ها وضع نموده‌اند (علامه و رزاقی، ۱۳۸۰). اتحادیه اروپا در سال ۲۰۱۰ حد مجاز برای آفلاتوکسین B_1 را مقدارppb ۸ برای مجموع آفلاتوکسین‌ها ۱۰ppb، تعیین نموده است (European Commission, 2010). در ایالات متحده آمریکا، مواد غذایی یا دارویی که بیش ازppb ۲۰ آفلاتوکسین داشته باشند، از نظر قانونی برای فروش، واردات و صادرات ممنوع شده‌اند (Trial *et al*., 1995; Gourama and Bullerman, 1995).

بمنظور ارزیابی کیفیت مواد غذایی و نیز بررسی حضور مایکوتوکسین‌ها، شناسایی قارچ‌های توکسین‌زا امری ضروریست (Suanthie *et al*., 2009). روش‌های مرسوم جهت تشخیص قارچ‌ها در مواد غذایی بر اساس روش‌های مبتنی بر کشت و صفات میکروسکوپی، نیازمند کار آزمایشگاهی فشرده بوده و بسیار وقت‌گیر می‌باشند (Shapira *et al*. 1996). اخیراً روش‌های مولکولی مانند واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، بدلیل حساسیت بالا، اختصاصی و سریع بودن، تبدیل به یک ابزار مقتدر جهت تشخیص قارچ‌های توکسین‌زا گردیده است (Konietzny and Greiner 2003).

بسیاری از ژن‌های دخیل در بیوسنتز مایکوتوکسین‌ها شناسایی شده‌اند و توالی DNA آن‌ها منتشر شده است. از روش PCR می‌توان برای تشخیص آسپرژیلوس‌های مولد آفلاتوکسین بر پایه ژن‌های ساختاری (*nor1*، *ver1* و *omtA*) کدکننده آنزیم‌های کلیدی در مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین و ژن تنظیمی *aflR*، استفاده نمود (Geisen, 1996; Shapira *et al*., 1996; Chen *et al*., 2002; Criseo *et al*., 2001).

با توجه به اهمیت اقتصادی و بهداشتی آفلاتوکسین‌ها، هدف از انجام این پژوهش شناسایی جدایه های قارچی متعلق به جنس آسپرژیلوس و ردیابی ژن‌های دخیل در مسیر تولید آفلاتوکسین بااستفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز توسط جفت آغازگرهای اختصاصی، همچنین بررسی رابطه احتمالی بین حضور کپک آسپرژیلوس و ژن‌های مولد آفلاتوکسین با متغیرهای اندازه‌گیری شده (میزان رطوبت پسته، شمارش میکروارگانیسم‌های مزوفیل و شمارش کپک و مخمر) در نمونه‌های پسته جمع‌آوری شده از شهرستان‌های گناباد و فیض‌آباد بود.

مواد و روش

جمع‌آوری نمونه‌ها

در شهریورماه ۱۳۹۲، ۳۰ نمونه پسته خام متعلق به مناطق مختلف کشت پسته در شهرستان‌های گناباد و فیض‌آباد، طبق روش نمونه‌برداری از مغزهای درختی برای آزمون آفلاتوکسین و به‌صورت تصادفی جمع‌آوری گردید (استاندارد ملی ایران، شماره ۱۳۵۳۴). نمونه‌ها در کیسه‌های پلاستیکی زیپ‌دار بسته‌بندی و پس از انتقال به آزمایشگاه، تا انجام آزمایش در یخچال نگهداری شدند.

اندازه‌گیری رطوبت

رطوبت نمونه‌های پسته با استفاده از روش حرارتی و براساس اختلاف وزن نمونه‌ها قبل و بعد از خشک کردن در دمای ۱۰۰-۹۵ درجه سانتی‌گراد تعیین گردید (استاندارد ملی ایران، شماره ۲۱۸).

شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها

بمنظور شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها، از محیط کشت پلیت کانت آگار[1] طبق استاندارد ملی ایران، شماره ۵۲۷۲ استفاده شد.

شناسایی و شمارش کپک‌ها و مخمرها

کشت کپک‌ها و مخمرها با استفاده از محیط کشت یست گلوکز کلرامفنیکل آگار[2] صورت گرفت. در پایان دوره گرمخانه‌گذاری نتایج شمارش بصورت واحدهای تشکیل دهنده پرگنه[3] در هر گرم از نمونه گزارش شدند. شناسایی کپک‌ها در سطح جنس با مشاهده

1 Plate Count Agar (PCA)
2 Yeast Glucose Chloramphenicol (YGC) Agar
3 CFU

میکروسکوپی و براساس ساختمان کپک انجام شد (استاندارد ملی ایران، شمارهٔ ۲-۱۰۸۹۹).

خالص‌سازی کپک‌ها

خالص‌سازی جدایه‌های قارچی با استفاده از محیط کشت پوتیتو دکستروز آگار[1] انجام شد (Rahimi *et al.*, 2008). خالص‌سازی توسط آنس سوزنی استریل از جدایه‌های آسپرژیلوس برداشته شد و در پلیت حاوی پوتیتو دکستروز آگار در ۳ نقطه دور از هم کشت گردید. پلیت‌ها در تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ روز گرمخانه‌گذاری شدند

استخراج DNA

بمنظور رشد میسلیوم قارچی و استخراج DNA از محیط کشت پوتیتو دکستروز براث[2] استفاده گردید. گرمخانه‌گذاری درون انکوباتور شیکردار (۱۵۰ دور در دقیقه) به‌مدت ۵ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انجام شد. توده میسلیومی حاصل منجمد و توسط نیتروژن مایع تبدیل به پودر یکنواختی گردید (Shapira *et al.*, 1996; Rahimi *et al.*, 2008). استخراج DNA به روش کلاسیک، بر پایهٔ قرار دادن نمونه‌ها در معرض بافر استخراج CTAB[3] (دویل و دویل[4])، تخلیص با حلال‌های آلی مانندکلروفرم/ایزوآمیل‌الکل و در نهایت ترسیب توسط ایزوپروپانول سرد صورت گرفت (Konietzny and Greiner, 2003). DNAهای حاصل در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد جهت استفاده در مراحل بعدی نگهداری شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از یک جفت آغازگراختصاصی جنس آسپرژیلوس (*Asp1/Asp2*) و ۳ جفت آغازگر APA-450/APA-1482، *ver1/ver2* وOMT-208/OMT-1232 (جدول ۱) جهت ردیابی ژن‌های دخیل در تولید آفلاتوکسین انجام شد (Shapira *et al.* 1996; Melchers *et al.* 1994). اجزای واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۰/۵ میکرولیتر از هر آغازگر رفت و برگشت ، ۱ میکرولیتر ازDNA الگو، ۱۲/۵ میکرولیتر کیت رد مستر میکس PCR و ۱۰/۵ میکرولیتر آب مقطر بود. برنامه زمانی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در جدول ۲ آمده است. برای مشاهده محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، الکتروفورز با شدت ولتاژ ثابت ۸۰ ولت به مدت ۱ ساعت در ژل آگارز ۱٪ و بافر تی بی ای[5] انجام گردید. عکس‌برداری از قطعات DNA رنگ‌آمیزی شده توسط گرین ویوار[6] با استفاده از دستگاه ژل داکیومنت[7]، تحت نور ماوراءبنفش صورت گرفت. محصولات واکنش PCR به همراه آغازگرهای شناسایی ژن‌های مولد آفلاتوکسین بمنظور تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال و توالی‌یابی یک‌طرفه قطعات مورد نظر با آغازگرهای رفت صورت گرفت. توالی‌های بدست آمده با استفاده از الگوریتم BLAST[8] موجود در پایگاه ژن مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی[9] با توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه گردید.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

رابطه احتمالی بین حضور کپک آسپرژیلوس و ژن‌های دخیل در مسیر تولید آفلاتوکسین با متغیرهای اندازه‌گیری شده (شمارش میکروارگانیسم‌های مزوفیل، شمارش کپک و مخمر و میزان رطوبت پسته) در نمونه‌های پسته (جدول ۳)، توسط نرم افزار Minitab و با محاسبه ضریب همبستگی[10] مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج و بحث

شناسایی جدایه‌های قارچی

قارچ‌های آلوده‌کننده نمونه‌های پسته، بلحاظ شکل ظاهری، رنگ پرگنه و ویژگی‌های میکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفتند و۳۰ جدایه قارچی متعلق به جنس آسپرژیلوس شناسایی شدند. در زیر میکروسکوپ کونیدیوفورهای مستقیم مشاهده گردید که در انتها به یک وزیکول پوشیده شده با لایه‌ای از فیالیدهای فلاسکی شکل ختم می‌شد وکنیدی‌های تک سلولی وکروی شکل شفاف یا رنگی، به‌صورت زنجیر به استریگما متصل شده بودند (Vyzantiadis *et al.*, 2012). جدایه‌های شناسایی شده به دو رنگ سبز مایل به زرد و سبزه تیره بودند.

در مطالعه‌ای که Mojtahedi و همکاران (۱۹۷۹) بر روی پسته ایران انجام دادند، فلور قارچ اصلی روی میوه پسته آسپرژیلوس معرفی شد. در این تحقیق، ۱۳ گونه آسپرژیلوس از میوه‌های پسته گزارش شدند که گونه غالب *A.niger* تعیین گردید. رحیمی و همکاران (۱۳۸۶) نیز بیش از ۲۳۰ جدایه قارچی از میوه‌های پسته باغ‌های اصفهان، کرمان و رفسنجان، انبارها و همچنین نخاله‌های پسته ریخته شده در باغ‌های مختلف بدست آوردند که بر اساس مطالعات مورفولوژیکی، ۱۷۰ جدایه متعلق به گونه‌های مختلف آسپرژیلوس

1 Potato Dextrose Agar (PDA)
2 Potato Dextrose Broth (PDB)
3 Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
4 Doyle and Doyle
5 TBE

6 Green viewer
7 Gel Documentation
8 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)
9 National Center for Biotechnology Information (NCBI)
10 Coefficient of Correlation

بودند. در میان آسپرژیلوس‌های جمع‌آوری شده از باغ‌های پسته *A.niger* بیشترین فراوانی را داشت و پس از آن *A.flavus*، *A.ochraceus* و *A.terreus* قرار داشتند.

نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

دراین مطالعه، PCR با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی شناسایی جنس آسپرژیلوس (*Asp1/Asp2*) جهت تکثیر ناحیه 18S rRNA انجام شد و در تمامی جدایه‌های جداسازی شده از نمونه‌های پسته یک باند DNA در حدود ۳۶۳ جفت باز مشاهده گردید. همچنین ردیابی ژن‌های مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین توسط آغازگرهای *ver1/ver2*، OMT-208/OMT-1232 وAPA-450/APA-1482 صورت گرفت. نتایج نشان داد که از میان ۳۰ جدایه قارچی، ۱۲ نمونه باتوجه به تولید قطعات با اندازه ۱۰۲۴ جفت باز، حاوی ژن *omtA* و ۴ نمونه با ایجاد باندهای ۵۳۷ جفت بازی، حاوی ژن *ver1* می‌باشند (شکل ۱)، درحالی‌که در هیچ‌یک از جدایه‌های قارچی ژن تنظیمی *aflR* مشاهده نشد. همچنین بررسی نتایج توالی‌یابی یک‌طرفه قطعات حاصل از PCR و مقایسه آن با داده‌های پایگاه اطلاعاتی بانک ژن DNA، تشابه کامل این توالی را با ژن هدف نشان داد.

در تحقیقی که توسط نجفی و همکاران (۱۳۸۸) روی نمونه‌های پسته صورت گرفت، با استفاده از ژن تنظیمی مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین (*aflR*)، PCR اختصاصی جهت شناسایی جدایه‌های توکسین‌زا به کمک دو آغازگر *aflR*-1 و *aflR*-2 انجام شد که در تمامی جدایه‌های جداسازی شده از پسته یک باند DNA در حدود ۷۹۸ جفت باز مشاهده گردید. همچنین در مطالعه دیگری Rahimi و همکاران (۲۰۰۸) به منظور بررسی و شناسایی جدایه‌های آسپرژیلوس فلاووس و پارازیتیکوس موجود در نمونه‌های پسته از دو جفت آغازگر اختصاصی ژن‌های تنظیمی *aflR* و *aflJ* (aflR-F/aflR-R) و (aflJ-F/aflJ-R) استفاده کردند که در تمامی جدایه‌های آسپرژیلوس پارازیتیکوس و ۳۳ جدایه آسپرژیلوس فلاووس جداسازی شده از پسته، با استفاده از جفت آغازگر aflR، یک باند DNA در حدود ۶۲۹ جفت باز مشاهده گردید، درحالی‌که جفت آغازگر اختصاصی aflJ، تنها در ۳۹ جدایه آسپرژیلوس فلاووس، یک قطعه ۸۴۰ جفت بازی را تکثیر نمود. از میان جدایه‌های آسپرژیلوس فلاووس مورد بررسی، ۱۹ جدایه با هر دو آغازگر aflR و aflJ نتایج مثبتی را نشان دادند.

گرچه *omtA* و *ver1* ژن‌های ساختمانی هستند که در مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین عمل نموده و در تولید آنزیم‌های کلیدی برای تولید آفلاتوکسین ضروری هستند (Geisen, 1996)، اما مطالعات نشان داده است که در مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین یکسری ژن تنظیم‌کننده مانند *aflR* وجود دارد که بر روی ژن‌های ساختاری تاثیر گذارده و باعث فعال‌سازی نسخه‌بردای در آن‌ها می‌شود. در صورت عدم وجود این ژن‌ها قارچ قادر به تولید سم نخواهد بود (ارمی و همکاران، ۱۳۹۰). نتایج حاصل از این پژوهش نیز نشان می‌دهد که هر چند بعضی از جدایه‌ها یک یا دو ژن ساختاری دخیل در مسیر بیوسنتزآفلاتوکسین را دارند ولی با توجه به عدم حضور ژن تنظیمی *aflR*، بصورت بالقوه قادر به تولید آفلاتوکسین نمی‌باشند.

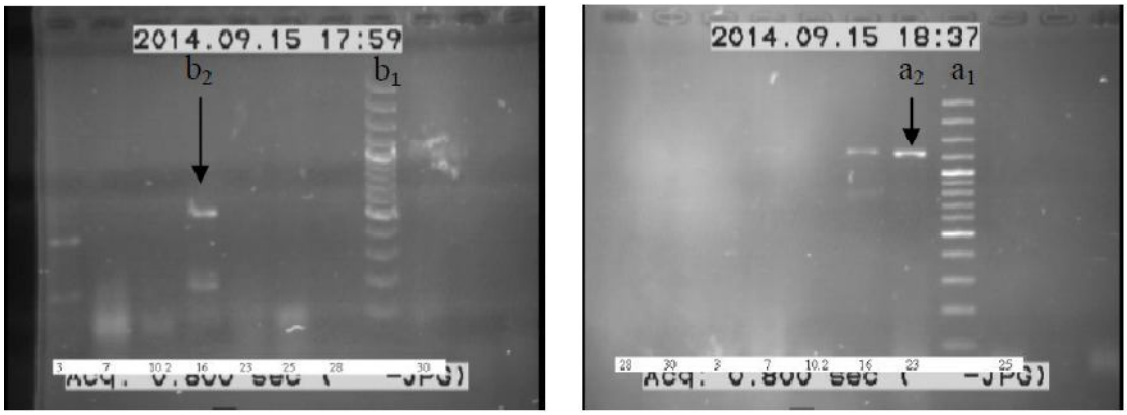
جدول ۱- آغازگرهای مخصوص شناسایی جنس آسپرژیلوس و ژن‌های مولد آفلاتوکسین

آغازگر	ژن هدف	توالی آغازگر(۵′→۳′)	اندازه محصول PCR (bp)	منبع
Asp1		CGGCCCTTAAATAGCCCGGTC	۳۶۳	Melchers *et al*. 1994
Asp2		ACCCCCCTGAGCCAGTCCG		
APA-450	*aflR*	TATCTCCCCCCGGGCATCTCCCGG	۱۰۳۲	Schnerr *et al*., 2002
APA-1482		CCGTCAGACAGCCACTGGACACGG		
Ver1	*ver 1*	GCCGCAGGCCGCGGAGAAAGTGGT	۵۳۷	Geisen, 1996
Ver2		GGGGATATACTCCCGCGACACAGCC		
OMT-208	*Omt A*	GGCCCGGTTCCTTGGCTCCTAAGC	۱۰۲۴	Schnerr *et al*., 2002
OMT-1232		CGCCCCAGTGAGACCCTTCCTCG		

جدول ۲- برنامه زمانی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت ردیابی ژن‌های مولد آفلاتوکسین

نام مرحله	درجه حرارت (سانتی‌گراد)	مدت زمان	تعداد سیکل
واسرشت اولیه	۹۴	۵ دقیقه	۱
واسرشت سازی[1]	۹۴	۳۰ ثانیه	۳۵
اتصال پرایمرها[2]	۶۵	۳۵ ثانیه	۳۵
سنتز قطعه مورد نظر	۷۲	۴۰ ثانیه	۳۵
گسترش نهایی	۷۲	۱۰ دقیقه	۱

1 Denaturation
2Annealing



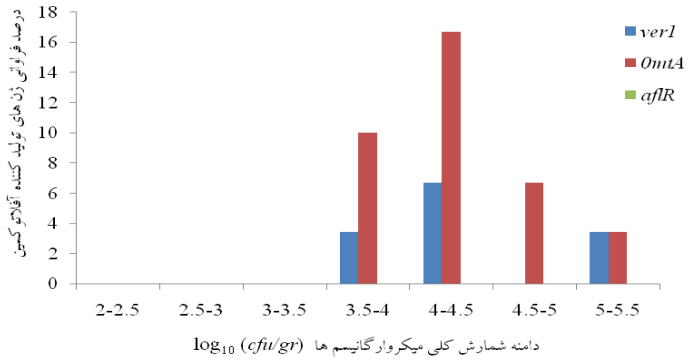
b a

شکل ۱- الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱٪

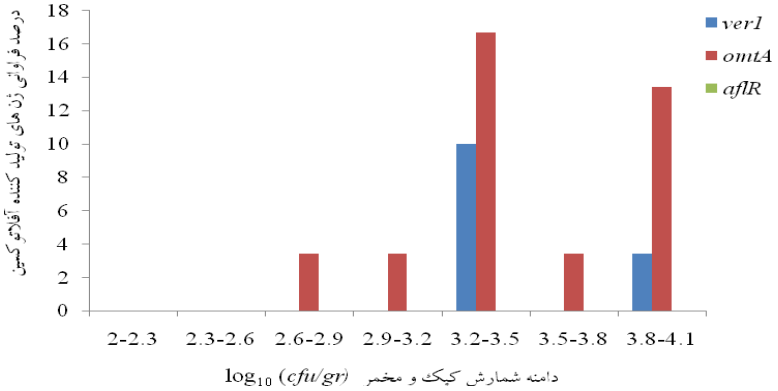
a_1 و b_1 نشانگر مولکولی ۱۰۰ bp، a_2 (۱۰۲٤bp) *OmtA*، و b_2 (۵۳۷ bp) *ver1*

بررسی میزان فراوانی ژن‌های مولد آفلاتوکسین در نمونه‌های پسته خام

در این مطالعه میزان فراوانی ژن‌های دخیل در مسیر تولید آفلاتوکسین (*omtA*، *ver1* و *aflR*) در دامنه‌های مختلف شمارش کلی میکروارگانیسم‌های مزوفیل و شمارش کپک و مخمرها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد در دامنه لگاریتمی (*cfu/gr*) ۴/۵-۴ از شمارش کلی میکروارگانیسم‌های مزوفیل، ژن‌های *omtA* و ver1 از بیشترین میزان فراوانی برخوردار می‌باشند (شکل ۲). همانطور که در شکل ۳ مشخص است، بیشترین درصد فراوانی ژن های *omtA* و *ver1* در دامنه لگاریتمی (*cfu/gr*) ۳/۵-۳/۲ از شمارش کپک و مخمرها واقع شده‌اند.



شکل ۲- فراوانی ژن‌های مولد آفلاتوکسین در دامنه شمارش کلی میکروارگانیسم‌های مزوفیل



شکل ۳: فراوانی ژن‌های مولد آفلاتوکسین در دامنه شمارش کپک و مخمر

بررسی ارتباط بین حضور کپک آسپرژیلوس و ژن‌های *omtA* و *ver1* براساس دامنه رطوبت در پسته خام

بمنظور بررسی وجود رابطه احتمالی بین حضور کپک آسپرژیلوس و ژن‌های *omtA* و *ver1* در دامنه‌های مختلف رطوبت دانه‌های پسته، ضریب همبستگی محاسبه گردید. ضریب همبستگی بین حضور کپک آسپرژیلوس با ژن‌های ساختاری *omtA* و *ver1*، به‌ترتیب ۰/۹۴۵ و ۰/۹۶۱ بدست آمد (جدول ۴). نتایج نشان داد که بین حضور کپک آسپرژیلوس و ژن‌های *ver1* و *omtA* براساس دامنه رطوبت، رابطه مستقیمی وجود دارد، یعنی با افزایش حضور کپک آسپرژیلوس در نمونه‌های پسته، میزان حضور ژن‌های مذکور نیز افزایش می‌یابد ($p<۰/۰۵$).

بررسی ارتباط بین حضور کپک آسپرژیلوس و ژن‌های *omtA* و *ver1* براساس دامنه شمارش کپک و مخمر در پسته خام برای نشان دادن رابطه بین حضور کپک آسپرژیلوس و ژن‌های *omtA* و *ver1* بر اساس دامنه‌های مختلف شمارش کپک ومخمر در پسته، ضریب همبستگی محاسبه شد. ضریب همبستگی بین حضور کپک آسپرژیلوس و ژن‌های ساختاری *omtA* و *ver1* در دامنه شمارش کپک و مخمرها، به‌ترتیب ۰/۳۱۲ و ۰/۴۴۲ محاسبه گردید. نتایج بررسی‌های آماری نشان داد که بین حضور کپک آسپرژیلوس و ژن‌های *omtA* و *ver1* رابطه معنی داری وجود ندارد (جدول ۵).

بررسی ارتباط بین حضور کپک آسپرژیلوس و ژن‌های *omtA* و *ver1* براساس دامنه شمارش کلی میکروارگانیسم‌های مزوفیل در پسته خام جهت بررسی رابطه بین حضور کپک آسپرژیلوس و ژن‌های *omtA* و *ver1* در دامنه شمارش کلی میکروارگانیسم‌های مزوفیل موجود در نمونه‌های پسته، ضریب همبستگی محاسبه گردید. ضریب همبستگی بین حضور کپک آسپرژیلوس و ژن‌های *omtA* و *ver1* به‌ترتیب ۰/۴۵۴ و ۰/۲۰۴ محاسبه گردید. ارتباط معنی داری بین حضور کپک آسپرژیلوس و ژن‌های *ver1* و *omtA* مشاهده نگردید (جدول۶).

آلودگی قارچی در دانه‌ها ممکن است طی مراحل مختلف رشد گیاه، زمان برداشت، حمل و نقل و نگهداری بروز نماید و در صورت وجود شرایط مناسب، منجر به رشد و گسترش قارچ در دانه‌ها و متعاقبا تولید مایکوتوکسین‌ها شود (Khodavaisy *et al.* 2012). آفلاتوکسین‌ها از جمله مهمترین مایکوتوکسین‌ها هستند که عمدتا توسط گونه‌های مختلف آسپرژیلوس بویژه آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس تولید می‌شوند (رزاقی و همکاران، ۱۳۹۰). آسپرژیلوس فلاووس مولد آفلاتوکسین‌های B_1 و B_2 است، درحالی که آسپرژیلوس پارازیتیکوس هر ۴ نوع آفلاتوکسین B_1، B_2، G_1 و G_2 را تولید می‌کند (Yu *et al.* 2004; Xu *et al.* 2000). قارچ آسپرژیلوس فلاووس با ایجاد اثرات نامطلوب بر سلامت انسان‌ها، بعنوان متداول‌ترین عامل آلوده‌کننده محصولات کشاورزی از جمله بادام زمینی و پسته محسوب می‌گردد.

در تحقیقی که توسط Khodavaisy و همکاران (۲۰۱۲) بر روی نمونه‌های بادام زمینی و پسته خشک صورت گرفت، انواع آسپرژیلوس‌ها به‌عنوان شایع‌ترین عوامل آلودگی شناسایی شدند، بطوری‌که *A.flavus* بالاترین میزان متوسط آلودگی را در مغزهای پسته و بادام زمینی، به‌ترتیب با $۰/۳۳ \times ۱۰^{۳}$ و $۰/۲۹ \times ۱۰^{۳}$ cfu/gr ایجاد کرد.

تولید آفلاتوکسین‌ها به‌وسیله فاکتورهای مختلف نظیر ویژگی‌های ژنتیکی قارچ‌های مولد، دما، رطوبت، ترکیب شیمیایی ماده غذایی و عوامل ضد میکروبی تولید شده به وسیله سایر میکروارگانیسم‌ها و یا سوبستراهای گیاهی قارچ‌های رشته‌ای تحت تاثیر قرار می‌گیرد (علامه و رزاقی، ۱۳۸۰). مغزهای خوراکی از جمله پسته ممکن است در حین برداشت، حمل و نقل و فرآوری دچار آلودگی‌های قارچی شوند، لذا در صورت وجود شرایط دمایی و رطوبت‌نسبی مناسب، فعالیت آبی مغز دانه افزایش یافته که منجر به رشد و گسترش قارچ و تولید مایکوتوکسین‌ها از جمله آفلاتوکسین‌ها می‌گردد (توکلی‌پور و همکاران، ۱۳۹۱). اگرچه حضور قارچ نمی‌تواند دلیلی بر وجود مایکوتوکسین باشد، اما با رشد کپک احتمال وجود مایکوتوکسین افزایش می‌یابد (فراجی و همکاران، ۱۳۸۹). در این پژوهش نیز نتایج بررسی‌های آماری نشان داد که در دامنه شمارش کپک و مخمرها، ارتباط معنی‌داری بین حضور کپک آسپرژیلوس و ژن‌های *omtA* و *ver1* وجود ندارد (جدول ۵).

آفلاتوکسین‌ها بصورت بهینه در دماهای بین ۲۸ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد تولید می‌شوند و هنگامی‌که دما به دمای بهینه رشد قارچ‌ها نزدیک می‌شود (۳۷ درجه سانتی‌گراد) تولید آفلاتوکسین کاهش می‌یابد. همچنین رطوبت نسبی هوا باید حداقل ۸۵ درصد و رطوبت دانه نیز حداقل ۸ درصد باشد تا شرایط تولید آفلاتوکسین مهیا گردد (رزاقی ابیانه و همکاران، ۱۳۹۰). Khodavaisy و همکاران گزارش کرده‌اند که بیشترین احتمال پرگنه‌زایی توسط قارچ‌های آسپرژیلوس فلاووس در نمونه‌های بادام زمینی و پسته خشک، در رطوبت نسبی ۵۵ درصد و دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد فراهم می‌گردد و بین آلودگی نمونه‌های مذکور توسط گونه *A.flavus* با مقدار بالای رطوبت، رابطه معنی‌داری وجود دارد ($p<۰/۰۵$).

جدول ۳- متغیرهای اندازه‌گیری شده در پسته خام و نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

نمونه	رطوبت (درصد وزنی)	شمارش کلی میکروارگانیسم‌های مزوفیل log_{10} (cfu/gr)	شمارش کپک و مخمر log_{10} (cfu/gr)	*aflR*	*OmtA*	*ver1*
۱	۱/۲۴	۲/۶۲۳	۲/۲۵۵	−	−	−
۲	۳/۱۴	۳/۷۹۹	۳/۷۳۲	−	+	−
۳	۳/۱۳۸	۲/۶۹۰	۲/۱۱۳	−	−	−
۴	۶/۵۵۸	۲/۴۹۱	۲/۵۵۶	−	−	−
۵	۳/۵۷۸	۳/۷۱۶	۳/۰۴۱	−	−	−
۶	۳/۷۵۸	۴/۸۲۶	۳/۸۴۵	−	+	−
۷	۴/۳۳۶	۳/۹۲۹	۳/۲۳۰	−	+	+
۸	۴/۰۹۸	۲/۹۱۳	۲/۴۷۷	−	−	−
۹	۳/۴۳۹	۳/۵۴۴	۲/۷۵۵	−	+	−
۱۰	۴/۸	۴/۲۳۰	۳/۹۸۲	−	+	−
۱۱	۳/۸	۲/۹۲۴	۲/۵۵۶	−	−	−
۱۲	۳/۳۸	۲/۴۶۲	۲/۱۴۶	−	−	−
۱۳	۲/۴۷۹	۳/۱۱۳	۲/۹۵۴	−	−	−
۱۴	۳/۰۳۷	۲/۸۴۵	۲/۳۸۰	−	−	−
۱۵	۲/۵۷۷	۳/۸۲۶	۳/۶۹۸	−	−	−
۱۶	۳/۳۵۶	۴/۰۴۱	۳/۲۵۵	−	+	+
۱۷	۳/۵۹۶	۴/۹۵۴	۳/۶۰۲	−	−	−
۱۸	۴/۱۹۶	۴/۱۴۶	۳/۳۸۰	−	+	−
۱۹	۳/۸۳۶	۲/۵۵۶	۲/۳۲۲	−	−	−
۲۰	۳/۶۳۹	۴	۳/۵۰۵	−	−	−
۲۱	۳/۹۹۶	۴/۰۴۱	۲/۶۳۳	−	−	−
۲۲	۳/۶۷۸	۵	۳/۲۳۰	−	+	+
۲۳	۴/۳۰۷	۳/۳۲۲	۲/۹۰۳	−	+	−
۲۴	۴	۴/۹۶۳	۳/۳۴۲	−	+	−
۲۵	۲/۸۶۷	۳/۸۸۰	۳/۸۳۲	−	−	−
۲۶	۳/۳۱	۲/۴۳۱	۲/۲۳۰	−	−	−
۲۷	۳/۶۷۲	۴	۳/۹۳۴	−	+	+
۲۸	۳/۵۵	۳/۱۱۳	۲/۷۷۸	−	−	−
۲۹	۳/۴۱۵	۲/۱۷۶	۲/۰۴۱	−	−	−
۳۰	۳/۰۲	۴/۴۳۱	۳/۹۵۴	−	+	−

جدول ٤-همبستگی بین حضور کپک آسپرژیلوس و ژن‌های *omtA* و *ver1* براساس دامنه رطوبت

دامنه رطوبت	حضور آسپرژیلوس	حضور ژن *omtA*	حضور ژن *ver1*
۱/۱-۲/۱	۰/۰۳۴	۰	۰
۲/۱-۳/۱	۰/۱۳۴	۰/۰۳۴	۰
۳/۱-۴/۱	۰/۵۶۷	۰/۲۶۷	۰/۱
۴/۱-۵/۱	۰/۱۳۴	۰/۱۳۴	۰/۰۳۴
۵/۱-۶/۱	۰	۰	۰
۶/۱-۷/۱	۰/۰۳۴	۰	۰
ضریب		۰/۹۴۵	۰/۹۶۱
کوواریانس		۰/۰۲۱۶۶۸۷	۰/۰۰۸۲۱۷۸۰

جدول ۵- همبستگی بین حضور کپک آسپرژیلوس و ژن‌های *omtA* و *ver1* براساس دامنه شمارش کپک و مخمر

دامنه شمارش کپک و مخمر	حضور آسپرژیلوس	حضور ژن *omtA*	حضور ژن *ver1*
۲-۲/۳	۰/۱۶۷	۰	۰
۲/۳-۲/۶	۰/۱۶۷	۰	۰
۲/۶-۲/۹	۰/۱	۰/۰۳۴	۰
۲/۹-۳/۲	۰/۱	۰/۰۳۴	۰
۳/۲-۳/۵	۰/۱۶۷	۰/۱۶۷	۰/۱
۳/۵-۳/۸	۰/۱۳۴	۰/۰۳۴	۰
۳/۸-۴/۱	۰/۱۶۷	۱/۱۳۴	۰/۰۳۴
ضریب همبستگی		۰/۳۱۲	۰/۴۴۲
کوواریانس		۰/۰۰۰۶۵۶۰۷	۰/۰۰۰۵۳۲۸۱

جدول ٦- همبستگی بین حضور کپک آسپرژیلوس و ژن‌های *omtA* و *ver1* براساس دامنه شمارش کلی میکروارگانیسم‌های مزوفیل

دامنه شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها	حضور آسپرژیلوس	حضور ژن *omtA*	حضور ژن *ver1*
۲-۲/۵	۰/۱۳۴	۰	۰
۲/۵-۳	۰/۲	۰	۰
۳-۳/۵	۰/۱	۰	۰
۳/۵-۴	۰/۲	۰/۱	۰/۰۳۴
۴-۴/۵	۰/۲	۰/۱۶۷	۰/۰۶۷
۴/۵-۵	۰/۱۳۴	۰/۰۶۷	۰
۵-۵/۵	۰/۰۳۴	۰/۰۳۴	۰/۰۳۴
ضریب همبستگی		۰/۴۵۴	۰/۲۰۴
کوواریانس		۰/۰۰۱۸۰۹۵۷	۰/۰۰۰۳۳۸۶۲

درک ارتباط این فاکتورهای محیطی با بیوسنتز آفلاتوکسین به‌عنوان یک امر مهم در تعیین نقش آفلاتوکسین در اکولوژی قارچ مولد سم ضروری است و می‌تواند به شناسایی مکان‌های هدف برای کنترل تولید آفلاتوکسین کمک کند (رزاقی و همکاران، ۱۳۹۰). چندین مطالعه در خصوص تاثیر شرایط محیطی بر روی میزان رشد قارچ‌ها و بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین انجام شده است، بطوری‌که تاثیر دو متغیر فعالیت آبی و دما بر روی بیان این ژن‌ها، میزان رشد و تولید آفلاتوکسین توسط دو گونه *A.flavus* و *A.parasiticus* نشان داده شده است (Schmidt-Heydt *et al.*, 2010 and 2011). Abdel-Hadi و همکاران (۲۰۱۰) نیز گزارش کردند که طی نگهداری دانه‌های بادام زمینی در سطوح مختلفی از aw، همبستگی مطلوبی بین بیان ژن ساختاری *aflD* (nor1) و تولید آفلاتوکسین B_1 توسط قارچ آسپرژیلوس فلاووس وجود دارد بطوری‌که، a_w بهینه برای بیان ژن *aflD* در طول ۲-۳ هفته اول ذخیره‌سازی دانه‌های بادام زمینی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، برابر با ۰/۹ می‌باشد. در تحقیق دیگری Schmidt-Heydt و همکاران (۲۰۰۸) اثر دما، pH و رطوبت نسبی را بر روی بیان چند ژن دخیل در بیوسنتز مایکوتوکسین چند گونه قارچی بانضمام دسته ژنی آفلاتوکسین در آسپرژیلوس پارازیتیکوس مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها دریافتند که شرایط استرسی حدواسط برای این ارگانیسم مطلوب‌ترین وضعیت برای تولید مایکوتوکسین را بوجود می آورد.

در این پژوهش نتایج بررسی‌های آماری، ، ارتباط منطقی و معنی داری را میان حضور کپک آسپرژیلوس و ژن‌های *omtA* و *ver1* بر اساس دامنه رطوبت در نمونه‌های پسته خام نشان داد ($p<۰/۰۵$). اما با توجه به اینکه عوامل دیگری مانند دما، pH و ترکیب شیمیایی دانه پسته می‌توانند در حضور کپک آسپرژیلوس و همچنین بیان ژن‌های مولد آفلاتوکسین موثر باشند، لذا باید ارتباط این عوامل نیز با میزان حضور کپک آسپرژیلوس و ژن‌های دخیل در مسیر تولید آفلاتوکسین بررسی شود.

منابع

Abdel-Hadi, A., Carter, D., Magan, N., 2010, Temporal monitoring of the nor-1 (aflD) gene of Aspergillus flavus in relation to aflatoxin B1 production during storage of peanuts under different environmental conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 109, 1914-1922.

Allameh, A., Razzaghi-Abyaneh, M., 1999, Mycotoxins, EmamHossein University, Tehran.

Calvo, A. M., Wilson, R. A., Bok, J. W., Keller, N. P., 2002, Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 447-459.

Chen, R.S., Tsay, J.G., Hung, Y.-F., Chion, R.Y.-Y, 2002, Polymerase chain reaction-mediated characterization of molds belonging to the Aspergillus flavus group and detection of Aspergillus parasiticus in peanut kernels by a multiplex polymerase chain reaction. *Journal of Food Protection*, 65, 840-844.

Criseo, G., Bagnara, A., Bisignano, G., 2001, Differentiation of aflatoxin-producing and non-producing strains of Aspergillus flavus group. *Letters in Applied Microbiology*, 33, 291-295.

Diener, U. L. and Davis, N. D., 1967, Limiting temperature and relative humidity for growth and production of aflatoxin and free fatty acids by Aspergillus flavus in sterile peanuts. *Journal of the American Oil Chemists'* Society, 44(1967), 259-263.

Doyle, J.J., Doyle, J.L., 1990, Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 12, 13-15.

Erami, M., Saffari, M., Pourbakhsh, S. A., Hashemi, S. J., 2011, Detecting the participating genes in aflatoxin production in suspected eggs for their primary screening, *Arak Medical University Journal (AMUJ)*, 14(55): 1-9.

European Commission (EC)., 2010, amending regulation (EC) No. 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. *Official Journal of the European Union*, L50, 8-12.

FAOSTAT., 2012, FAO Production, Consumption, Resources Statistics [on-line]. FAO.

Faraji, H., Tabatabayi-Yazdi, F., Kafilzadeh, F., Nasiri-Mahalati, M., 2000, Investigation of total aflatoxins in consumed rice at Mashhad city in the summer and winter, *Journal of Food Science and Technology*, 2(2): 11-16.

Geisen, R., 1996, Multiplex polymerase chain reaction for the detection of potential aflatoxin and sterigmatocystin producing fungi. *Systematic and Applied Microbiology*, 19, 388-392.

Gourama, H. and Bullerman, L., 1995, Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus: Aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds: A review. *Journal of Food Protection*, 58, 1395-1404.

Iranian National Standardization Organization, 2013, Pistachio kernel Specifications and test methods, 5th. Revision, 218.

Iranian National Standardization Organization, 2007, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Colony- count technique at 30 c, 1st.Revision, 5272.

Iranian National Standardization Organization, 2008, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of yeasts and molds - Part 2: Colony count technique in products with water activity less than or equal to 0.95, 1st. edition, 10899-2.

Iranian National Standardization Organization, 2010, Food stuffs- Method of sampling of tree nuts, peanuts, other oilseeds , apricot kernels and derived products for aflatoxin analysis-Code of practice, 1st. Edition, 13534.

Kabirian H.R., Afshari H., Mohammadi Moghadam M. and Hokmabadi H., 2011, Evaluation of pistachio contamination to Aspergillus flavus in Semnan provinc. *International Journal of Nuts and Related Sciences*, 2(3), 1-6.

Khodavaisy, S., Maleki, A., Hossainzade, B., Rezai, S., Ahmadi, F., Validi, A., Rashidi, A., Ghahramani, E., 2012, Occurrence of fungal contamination in pistachio and peanut samples from retail shops in Sanandaj province, Iran. *African Journal of Microbiology Research*, 6(39), 6781-6784.

Konietzny, U. and Greiner, R., 2003, The application of PCR in the detection of mycotoxigenic fungi in foods. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34, 283-300.

NajafiKahaki, A., 2009, Detection of Aspergillusflavus and Aspergillusparasiticus speciesproducing aflatoxin in pistachio by molecular methods, M.Sc. thesis, Tehran university digital library.

Melchers, W. J., verweij, P. E., Van den Hurk, P., Van Belkum, A., De Pauw, B. E., Hoogkamp-korstanje, J. A., Meis, J. F., 1994, General primer-mediated PCR for detection of Aspergillus species. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(7), 1710-1717.

Mojtahedi, H., Rabie, C. J., Lubben, A., Steyn, M. & Danesh, D., 1979, Toxic *Aspergillus from pistachio nuts. Mycopathologia*, 67, 123-127.

OBrian, G. R., Georgianna, D. R., Wilkinson, J. R., Yu, J., Abbas, H. K., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E., Nierman, W. C., Payne, G. A., 2007, The effect of elevated temperature on gene transcription and aflatoxin biosynthesis. *Mycologia*, 99, 232-239.

Rahimi, P., Sharifnabi, B., & Bahar, M., 2008, Detection of aflatoxin in Aspergillus species isolated from pistachio in iran. *Journal of Phytopathology*, 156, 15-20.

Rahimi, P., SharifNabi, B., Bahar, M., 2007, Aspergillus species isolated from pistachioand determination of their aflatoxin production, *Rostaniha*, 8(1): 30-42.

Razzaghi-Abyaneh, M., Shams-Ghahfarokhi, M. and Chang, P.-K., 2011, Aflatoxins: Mechanisms of inhibition by antagonistic plants and microorganisms. In: Guevara-Gonzalez, Ramon G. (Ed.), Aflatoxins: Biochemistry and Molecular Biology. INTECH Open *Access Publisher*, 285-304.

Razzaghi-Abyaneh, M., Pilehvar-Soltanabadi, Y., Shams-Ghahfarokhi, M., Alinezhad, S., 2011, Aflatoxins: public health and agricultural concerns, *Institute of Applied Science and Technology JahadDaneshgahi*, Tehran, 18-31.

Schmidt-Heydt, M., Magan, N., Geisen, R., 2008, Stress induction of mycotoxin biosynthesis genes by abiotic factors. FEMS *Microbiology Letters*, 284, 142-149.

Schmidt-Heydt, M., Rufer, C. E., Abdel-Hadi, A., Magan, N., Geisen, R, 2010, The production of aflatoxin B1 or G1 by Aspergillus parasiticus at various combinations of temperature and water activity is related to the ratio of aflS to aflR expression. *Mycotoxin Res*. 26, 241-246.

Schmidt-Heydt, M., Parra, R, Geisen, R. and Magan, N., 2011, Modelling the relationship between environmental factors, transcriptional genes and deoxynivalenol production by two Fusarium species. J. Royal Soc. *Interface* 8, 117-126.

Schnerr, H., Vogel, R. F., Niessen, L., 2002, Correlation between DNA of trichothecene-producing Fusarium species and deoxynivalenol concentrations in wheat-samples. *Letters in Applied Microbiology*, 35, 121-125.

Sedaghat, R., 2011, Constraints in production and marketing of iran's pistachio and the policies concerned: An application of the garret ranking technique. International Journal of Nuts and Related Sciences, 2(1), 27-30.

Shapira R., Paster N., Eyal O., Menasherov M., Mett A. and Salomon R., 1996, Detection of aflatoxigenic molds in grains by PCR. *Applied and Enviromental Microbiology*, 62, 3270-3273.

Shokraii, E. H. and Esen, A, 1988, Composition, solubility, and electrophoretic patterns of proteins isolated from kerman pistachio nuts (Pistacia vera L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36, 425-429.

Simsek, O., Arici, M. and Demir, C., 2002, Mycoflora of hazelnut (Corylus avellana L.) and aflatoxin content in hazelnut kernels artificially infected with Aspergillus parasiticus. *Nahrung* 46(3), 194-196.

Suanthie, Y., Cousin, M. A., Woloshuk, C. P., 2009, Multiplex real-time PCR for detection and quantification of mycotoxigenic Aspergillus, Penecillium and Fusarium. *Journal of stored products research*, 45, 139-145.

Trial, F., Mahanti, N. and Linz, J., 1995, Molecular biology of aflatoxin biosynthesis. Microbiology, 141, 755-765.

Tavakolipour, H., Javanmard, M., Zirjany, L., 2012, Antiaflatoxigenic activity of pistachio kernel coated by whey protein based edible film incorporated with zatariamultiflura essential oil, *Journal of Food Science and Technology*, 36(9): 11-19.

Vyzantiadis, T-A. A., Johnson, E. M., Kibbler, C. C., 2012, From the patient to the clinical mycology laboraty; how can we optimize microscopy and culture methods for mould identification. *Journal of Clinical Pathology*, 65, 475-483.

Wen, Y., Hatabayashi, H., Arai, H., Kitamoto, H. and Yabe, K., 2004, Function of the cypX and moxY genes in aflatoxin biosynthesis in Aspergillus parasiticus. *Applied and Environmental Microbiology*, 6, 3192-3198.

Xu, H. X., Annis, S., Linz, J. and Trail, F., 2000, Infection and colonization of peanut pods by Aspergillus parasiticus and the expression of the aflatoxin biosynthetic gene, nor-1, in infection hyphae. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 56(5), 185-196.

Yu, J., Chang, P.-K., Ehrlich, K. C., Cary, J. W., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E., Payne, G. A., Linz, J. E., Woloshuk, C. P. and Bennett, J. W., 2004, Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 1253-1262.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 12, No. 2, June. July. 2016, p. 318- 329

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۲، شماره ۲، خرداد-تیر ۱۳۹۵ ص.۳۲۹-۳۱۸

A molecular method for identification of aflatoxigenic fungi in pistachio of Khorasan region (Gonabad and Feyzabad)

N. Pourebrahim[1], M. Yavarmanesh*[2]

Received: 2014.12.24
Accepted: 2016.04.04

Introduction: Pistachio nut is one of the popular tree nuts. Among the different species of the genus *Pistacia*, only the fruits of *Pistacia vera* attain optimal size to be acceptable to consumers as edible nuts. Contamination of pistachio by *Aspergillus* species and their mycotoxins is the most important problem for consumption and export of this product. Aflatoxins are potent toxic, carcinogenic and mutagenic secondary metabolites primarily produced by two fungal species, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Aspergillus fla*vus produces AFB_1 and AFB_2, while *Aspergillus parasiticus* produces AFB_1, AFB_2, AFG_1 and AFG_2. Among four main groups of aflatoxins, AFB_1 is the most potent carcinogenic compound. Therefore, identification of toxigenic fungi is necessary for evaluating the foods quality and the presence of mycotoxins. The current methods being used for assessing fungi presence in foods based on cultivation methods and microscopic characteristics are time-consuming and labor-intensive. Recently, molecular techniques such as polymerase chain reaction (PCR) due to high sensitivity, specificity and rapidity has been introduced as powerful tools for detecting toxigenic fungi. Many genes involved in the biosynthesis of these mycotoxins have been identified and their DNA sequences have been published. PCR methods can be used to detect of aflatoxigenic *Aspergilli* based on structural genes (*nor1*, *ver1* and *omtA*) encoding key enzymes in aflatoxin biosynthesis pathway and the regulatory gene *aflR*.

Materials and method: Pistachio samples were collected from different cultivation regions of two towns including Gonabad and Feyzabad. Samples were packed in sterile plastic bags and immediately transferred to the laboratory. The moisture content of samples was determined using thermal method and drying in at 95-100°C. Among fungal isolates 30 *Aspergillus* genus were detected and purified by cultural-based methods using PDA (potato dextrose agar) medium. Colonies of the fungus were transferred to PDB (potato dextrose broth) medium and incubated for 5 days at 28°C with shaking at 150 rpm. The mycelium was frozen in liquid nitrogen and ground to a powder for later DNA isolation. DNA was extracted with CTAB (cetyl trimethyl ammonium bromide) extraction buffer, then was purified with organic solvents such as chloroform/isoamyl alcohol and finaly was precipitated by isopropanol. *Aspergillus* genus were detected using polymerase chain reaction by specific primer pair Asp1/Asp2 for amplification of 18S rRNA region. Furthermore, aflatoxigenic genes were detected by three sets of primers (APA-450/APA-1482, ver1/ver2 and OMT-208/OMT-1232). PCR was performed in a volume of 25 µl containing 0.5 µl of each primer, 12.5 µl of Taq DNA polymerase master mix red, 10.5 µl of sterile distilled water and 1 µl of genomic DNA as template. A PCR consisted of an initial denaturing step of 5 min at 94°C followed by 35 cycles (30 s at 94°C, 35 s at 65°C and 40 s at 72°C) finished by a final extension step at 72°C for 10 min. The PCR products were analyzed by electrophoresis on a 1% agarose gel in TBE.

Results and Discussion: Among fungal isolates 30 *Aspergillus* genus were detected using microscopic characterstics and colony color. Under the microscope, conidia were one-celled, spherical, hyaline or pigmented and they formed long chains. 12 and 4 out of 30 samples had *omtA* and *ver1* genes respectively. No observation was found for *aflR* regulatory gene in the fungal isolates. The results showed that although some isolates had one or two structural genes in the aflatoxin biosynthetic pathway, they could not produce aflatoxin due to not having any *aflR* gene. Coefficient of correlation was calculated to find the relationship between the existence of *Aspergillus* molds and aflatoxigenic genes in pistachio. The statistical results indicated that there is a significant

1- Former MSc Student, Department of Food Science and Technology, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran
2- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
(*Corresponding Authur E-Mail Address: yavarmanesh@um.ac.ir)

correlation between the enumeration of *Aspergillus* molds and the existence of genes (*omtA* and *ver1*) in different moisture domains ($p< 0.05$) while no significant correlation was identified between the enumeration of *Aspergillus* molds and the existence of genes in different domains of enumeration of mesophilic bacteria, yeasts and molds. Contamination of nut seeds by fungi occurs during growth, harvesting, transport and storage. The production of aflatoxin is affected by different factors, such as genetic properties of the producing fungi, temperature, moisture content, the chemical composition of food and antimicrobial agents produced by other microorganisms. Water stress and temperature are the most relevant environmental factors which influence fungal growth and mycotoxin production. Other studies showed that there was a good correlation between the expression of an early structural gene (*aflD*) and aflatoxin B_1 production in peanut seeds. Also previous studies have shown that there was a significant relationship between *A.flavus* contamination in the peanuts and pistachio with high humidity ($p< 0.05$). Since other factors such as temperature, pH and chemical composition of pistachio can affect the existence of *Aspergillus* molds and expression of aflatoxigenic genes, the influence of these factors on existence of *Aspergillus* molds and genes involved in aflatoxin biosynthesis pathway need to be investigated.

Keywords: Aspergillus, Aflatoxin, Pistachio, Aflatoxigenic genes, Polymerase chain reaction