



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

Zahra Salehi¹, Babak Kheirkhah², Zahra Masoumalinejad¹, Mohammad Reza Zinatizadeh³

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

Article Information

Article history:

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

Article Subject: Mycology

IJMM 2018; 12(1): 43-50

Corresponding author:

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

Tel: 09133454787

Email:

babakkheirkhah@yahoo.com

Use your device to scan
and read the article online



Abstract

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

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

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

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

Keywords: *Aspergillus*, Aflatoxin, Polymerase Chain Reaction

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

How to cite this article:

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



شناسایی ژن *afIR* در قارچ *آسپرژیلوس* مولد افلاتوکسین جداشده از مغز پسته در منطقه

سیرجان با استفاده از روش PCR در سال ۱۳۹۵

زهرا صالحی^۱، بابک خیرخواه^۲، زهرا معصومعلی نژاد^۱، محمدرضا زینتی زاده^۳

۱. گروه میکروبیولوژی، واحد سیرجان، دانشگاه آزاد اسلامی، سیرجان، ایران

۲. گروه میکروبیولوژی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران

۳. گروه ژنتیک، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، مازندران، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۶/۰۳/۲۷

پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۰۳

انتشار آنلاین: ۱۳۹۷/۰۲/۲۴

موضوع: قارچ شناسی

IJMM1397;12(1): 43-50

نویسنده مسئول:

بابک خیرخواه

استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد

کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان،

ایران

تلفن: ۰۹۱۳۳۴۵۴۷۸۷

پست الکترونیک:

babakkheirkhah@yahoo.com

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

مواد و روش کار: تعداد ۱۰۰ نمونه پسته آلوده به قارچ از انبارهای پسته در شهرستان سیرجان به روش هدفمند اخذ شد. نمونه‌ها به محیط کشت سابورو دکستروز برات منتقل شدند. کنترل مثبت استفاده شده در این پژوهش، سویه قارچ *آسپرژیلوس* مولد سم افلاتوکسین و کنترل منفی سوش قارچی غیر *آسپرژیلوس* و *آسپرژیلوس*‌های غیر افلاتوکسیک بودند. استخراج DNA با استفاده از کیت و از PCR برای شناسایی ژن *afIR* در نمونه‌های آلوده به قارچ انبارهای پسته استفاده شد.

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

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

کلمات کلیدی: *آسپرژیلوس*، افلاتوکسین، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

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

مقدمه

(۳). آلودگی پسته به گونه‌های قارچ *آسپرژیلوس* و مایکوتوکسین‌های آن، مهم‌ترین معضل در زمینه مصرف و صادرات این محصول محسوب می‌شود (۴).

افلاتوکسین‌ها گروهی از مایکوتوکسین‌ها و متابولیت‌های ثانویه با اثرات سمی، سرطان‌زایی و جهش‌زایی هستند که به طور عمده از گونه‌های *آسپرژیلوس* (*Aspergillus flavus*)، *Aspergillus parasiticus*، *Aspergillus nomius*، *Aspergillus ochraceoroseus* تولید می‌شوند. علاوه بر این بیش از ۵۰ گونه

پسته یکی از مهم‌ترین محصولات کشاورزی و باغی ایران است و استان کرمان بیشترین سطح زیر کشت تولید پسته در کشور را دارد (۱). برطبق آمار سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد (فائو)، ایران بزرگ‌ترین تولیدکننده پسته در دنیا است (۲). این محصول مقام دوم صادرات غیر نفتی کشور را بعد از فرش به خود اختصاص داده است. به همین دلیل پسته ایران در بین محصولات صادراتی و ارزآور کشور اهمیت خاصی داشته که باید برای حفظ و ارتقاء موقعیت جهانی آن تلاش بیشتری انجام داد

آموزش مردم از خطر رژیم غذایی آلودگی افلاتوکسین، برداشت زودهنگام، خشک کردن، بهداشت محیط، بهبود ساختار ذخیره سازی و کنترل بیولوژیکی باید انجام شود. همچنین در یکی از تحقیقات به عمل آمده، به نظر می رسد کمبود پروتئین، ظرفیت کبد را برای سم زدایی افلاتوکسین کاهش می دهد (۲۱).

با توجه به اهمیت اقتصادی و بهداشتی افلاتوکسین ها، هدف از انجام این تحقیق شناسایی ژن *aflR* در قارچ *Aspergillus* مولد افلاتوکسین جدا شده از مغز پسته در منطقه سیرجان در سال ۱۳۹۵ با استفاده از روش مولکولی است.

مواد و روش ها

نمونه برداری و جامعه مطالعه شده

در این مطالعه مقطعی در سال ۱۳۹۵ برای تهیه و جمع آوری نمونه های آلوده به قارچ در انبارهای پسته شهرستان سیرجان به طور تصادفی، تعداد ۱۰۰ نمونه اخذ شد. مغز پسته ها در ظروف استریل از قبل تهیه شده قرار گرفتند و در دمای 4°C به آزمایشگاه انتقال یافتند.

در آزمایشگاه نمونه ها به محیط کشت سابروز دکستروز برات منتقل شدند، که محیطی غنی و عمومی برای رشد اکثر قارچ ها است. با افزودن کلرامفنیکل به این محیط، رشد باکتری ها در آن متوقف شد. نمونه ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای $30-28^{\circ}\text{C}$ گرم-خانه گذاری شدند.

آزمایش قارچ شناسی

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

جداسازی و خالص سازی قارچ ها

جداسازی ایزوله های قارچی با استفاده از محیط کشت PDA (Merck Co. Germany) صورت گرفت. به منظور خالص سازی ایزوله های قارچی از روش سینگل اسپور استفاده شد. بدین صورت- که با آنس سوزنی ظریف میزان کمی از اسپور قارچی به لوله محتوی آب مقطر استریل منتقل و سپس به وسیله لام توما رقت آن محاسبه شد. پس از تهیه رقتی مناسب، قطره ای از سوسپانسیون حاصل به محیط کشت واتر آگار (Merck Co. Germany) انتقال یافت. پس از گذشت ۱۲ الی ۲۵ ساعت، از کلنی رشد یافته بر روی محیط واتر آگار، به محیط کشت PDA که قبلاً در پلیت استریل ریخته و سرد شده بود، در ۳ نقطه منتقل

دیگر از قارچ های رشته ای شامل چندین گونه از *Penicillium* و *Choetominum* نیز افلاتوکسین تولید می کنند (۵،۶). توکسین ها به عنوان عوامل زیستی شناخته شده اند که در مقادیر بسیار کم می توانند برای موجودات زنده از جمله انسان ها و حیوانات خطرناک و اغلب کشنده باشند و از دست دادن زمان می تواند صدمات جبران ناپذیری وارد کند (۷). افلاتوکسین ها اثرات استروژنی روی انسان و حیوان دارند (۸،۹).

آلودگی میوه های پسته به قارچ های تولیدکننده این توکسین، از باغ ها شروع شده و پس از برداشت در هنگام درجه بندی پسته ها با آب، میزان آلودگی به اسپور قارچ های مزبور به طور چشمگیری افزایش می یابد (۱۰). شناسایی و تشخیص بیوشیمیایی آنزیم های دخیل در چرخه متابولیکی بیوسنتز افلاتوکسین به جداسازی ژن های مسئول در تولید این آنزیم ها وابسته است (۱۱). تعداد ۲۵ ژنی که در بیوسنتز افلاتوکسین شرکت دارند، در ناحیه ۷۵ کیلو بازی از DNA بر روی کروموزوم گروه بندی شده اند (۶). نقش ژن *aflR* (ژن محافظت شده) در تنظیم تولید افلاتوکسین به اثبات رسیده است (۱۲). این ژن اختصاصی تنظیم کننده مثبت مسیر تولید افلاتوکسین، سبب فعال شدن رونویسی اکثر ژن ها می شود. اضافه کردن یک نسخه دیگر از این ژن سبب تولید مضاعف مواد حد واسط در بیوسنتز افلاتوکسین می شود (۱۳). رونویسی ژن های مسیر بیوسنتز افلاتوکسین با اتصال پروتئین AFLR به توالی پالیندرومیک در ناحیه پرموتور ژن های ساختمانی در *A.flavus* فعال می شود (۶). علاوه بر این، ژن های دیگری (*ordB* و *cypX*, *cypA*, *moxY* *aflT*) نیز در مسیر بیوسنتز افلاتوکسین یافت شده اند: *aflT* که یک پروتئین متصل شونده به غشاء را کد می کند و به نظر می رسد در ترشح افلاتوکسین مؤثر باشد (۱۲)؛ عملکرد ژن های *ordB* و *cypX*, *cypA*, *moxY* هنوز ناشناخته است (۱۳،۱۵).

به منظور ارزیابی کیفیت مواد غذایی و نیز بررسی حضور مایکوتوکسین ها، شناسایی قارچ های توکسین زا امری ضروری است (۱۶). روش های مرسوم برای تشخیص قارچ ها در مواد غذایی براساس روش های مبتنی بر کشت و مطالعات میکروسکوپی، نیازمند کار آزمایشگاهی فشرده بوده و بسیار وقت گیر هستند (۱۷)، اخیراً روش های مولکولی مثل واکنش زنجیرهای پلیمرز (PCR) به دلیل حساسیت بالا، اختصاصی و سریع بودن، تبدیل به یک ابزار مقتدر برای تشخیص قارچ های توکسین زا شده اند (۱۹،۲۰).

PCR

به منظور شناسایی ژن *aflR* در نمونه‌های آلوده به قارچ در انبارهای پسته از روش PCR استفاده شد. در این روش با استفاده از کیت Mastermix (سیناژن، ایران) تهیه و PCR انجام شد. توالی پرایمرهای استفاده شده در جدول ۱ ذکر شده است (۲۲). برای انجام PCR در حجم نهایی ۲۵ μL، ۱۲/۵ μL مسترمیکس، ۲ μL از DNA باکتری (با غلظت ۱/۹ نانوگرم)، ۱ μL از پرایمرها (۱۰۰ pmol) و ۸/۵ μL آب مقطر استریل به کار رفت. همچنین در جدول ۲ واکنش PCR طبق برنامه مربوطه انجام شد. آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از تست آماری ANOVA با نرم‌افزار SPSS ورژن ۱۸ انجام گرفت.

شده و به مدت ۴ روز در دمای ۲۴°C گرم‌خانه‌گذاری شد. در نهایت براساس خصوصیات میکروسکوپی و ماکروسکوپی گونه‌های *آسپرژیلوس* شناسایی شدند.

رسوب‌گیری و استخراج DNA

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

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

Fungus	Target	Sequence 5' to 3'	product size
<i>Aspergillus</i>	<i>aflR</i>	F: 5'-TATCTCCCCCGGGCATCTCCCGG-3/ R: 5'-GTCGGCGCCACGCACTGGGTTGGGG-3'	1032 bp

جدول ۲. برنامه درجه حرارت و زمان برای PCR

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

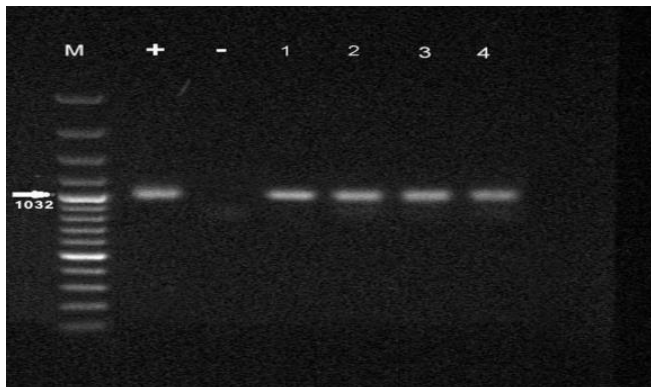
یافته‌ها

هاگ‌ها برداشته شده و در محیط دوم به صورت خطی کشت داده شدند تا خالص‌سازی کلنی‌ها به طور کامل انجام شود.

در شکل ۲ کلنی‌های رشد کرده در محیط رزبنگال کلنی‌های برجسته سفید، ابری و با مشاهده میکروسکوپی هیچ‌گونه کلنی دیگری که مشکوک به رشد سایر قارچ‌ها باشد، مشاهده نشد. در صورتی که کلنی مشکوکی دال بر رشد قارچ دیگری به چشم می‌خورد، آن پلیت حذف می‌شود.

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

در شکل ۱ کلنی‌های انبوه *آسپرژیلوس* را در محیط مذکور نشان می‌دهد. پس از این از کلنی‌های رشد کرده در محیط اول



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



شکل ۱. رشد کلنی های *آسپرژیلوس* در محیط رزبنگال

آگار



شکل ۲. رشد کلنی های *آسپرژیلوس* در محیط مجدد

رزبنگال آگار

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

نتایج مولکولی

پرایمری که در این مطالعه برای بررسی ژن مولد افلاتوکسین استفاده شد (جدول ۱)، با توالی فوروارد و ریورس تکثیر کننده ژن تنظیم کننده سنتز افلاتوکسین (*aflR*) بود (۲۲). از ۶۴ نمونه *آسپرژیلوس* بدست آمده از پسته، ۷ نمونه واجد ژن مولد افلاتوکسین و ۵۷ نمونه فاقد این ژن بودند (جدول ۳). از کل ۱۰۰ نمونه آزمایش شده، ۷٪ از نمونه ها واجد ژن مولد افلاتوکسین بوده و از میان کل نمونه های آلوده به قارچ *آسپرژیلوس* فقط ۱۰/۹۳٪ ژن مولد افلاتوکسین داشتند.

بحث

با توجه به اینکه فرآیند آلودگی به قارچ *آسپرژیلوس* و افلاتوکسین از پیچیدگی بسیار زیادی برخوردار است، به گونه ای که در بسیاری از موارد نابودسازی یا حتی کنترل آلودگی به توکسین، اتخاذ چندین رویکرد و روش مختلف را طلب می کند؛ لذا انجام فعالیت های تحقیقاتی در خصوص شناسایی ارقام مقاوم محصولات مختلف به قارچ *آسپرژیلوس* و افلاتوکسین و همچنین مطالعه در زمینه تأثیرات فیزیوشیمیایی پوسته مغز پسته در جلوگیری از رشد قارچ و تولید توکسین می تواند مبنای مناسبی برای کنترل آلودگی افلاتوکسین فراهم کند.

به این منظور در اکثر نقاط جهان تحقیقات گسترده و وسیعی برای شناسایی ارقام مقاوم محصولات زراعی و باغی، به قارچ *آسپرژیلوس* و افلاتوکسین و بررسی مکانیسم های مقاومت آنها در حال انجام است، که نتایج موفقیت آمیزی نیز از آنها گزارش می شود (۲۳).

مغز پسته تازه به عنوان یکی از مهم ترین خشکبار جهان، معروف به طلای سبز، در صنعت مواد غذایی و در صنعت لوازم آرایشی به کار می رود و از لحاظ صادرات جزء بزرگ ترین صادرات غیر نفتی در جهان است. در این مطالعه، مغز پسته شهرستان سیرجان که منبع اصلی تولید این محصول در جهان محسوب می شود، از نظر آلودگی قارچی و حضور ژن تنظیم کننده تولید افلاتوکسین بررسی شد.

افلاتوکسین ها گروه بزرگی از مایکوتوکسین ها را تشکیل می دهند. متابولیت های ثانویه با اثرات سمی، سرطان زایی و جهش زایی هستند که به طور عمده از سوی گونه های *آسپرژیلوس* *فلاووس* و *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* تولید می شوند (۲۴). عوامل

در تمامی جدایه‌های جداسازی شده از پسته یک باند DNA در حدود ۷۹۸ جفت باز به چشم خورد (۳۱). با توجه به اینکه در مطالعه حاضر از پرایمرهای دیگری برای تشخیص جدایه‌های توکسین‌زا استفاده شده است اما نتایج از لحاظ وجود جدایه‌های توکسین‌زا در نمونه‌های پسته مشابه می‌باشد.

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

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

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

محیطی مختلف مثل درجه حرارت و رطوبت نسبی مهم‌ترین فاکتورهای مؤثر در تولید آفات توکسین هستند. تولید بهینه آفات توکسین در دامنه دمایی °C ۳۵-۲۸ است (۲۵). مطالعات انجام شده نشان داده‌اند که درجه حرارت و رطوبت نسبی بهینه برای تولید آفات توکسین در پسته و فندق °C ۳۰-۲۵ و ۹۹-۹۷٪ است (۲۶، ۲۷).

در مطالعه‌ای که Mojtaehedi و همکاران 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* گزارش شد (۲۸). در مطالعه حاضر به بررسی گونه *آسپرژیلوس* پرداخته نشده و هدف شناسایی ژن *aflR* در قارچ *آسپرژیلوس* مولد آفات توکسین بوده است ولی می‌توان در تحقیقات بعدی به بررسی گونه غالب نیز پرداخته شود.

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

در مطالعه Mimoune و همکاران فراوان‌ترین قارچ‌های جدا شده از نمونه‌های پسته و همچنین در بادام و کنجد به ترتیب *آسپرژیلوس* با ۸۴/۶۹٪ و پنی‌سلیوم با ۹/۳٪ و موکور با ۴/۴۸٪ بوده که *آسپرژیلوس* رایج‌ترین جنس قارچ است و از این نظر با نتایج تحقیق حاضر همسویی دارد (۳۰). این نتایج نشان می‌دهند که *آسپرژیلوس* تولیدکننده آفات توکسین است و بیشتر به عنوان قارچ‌های انباری محسوب می‌شود و در شرایطی که رطوبت و درجه حرارت بالا هستند، تکثیر پیدا می‌کند. به طور کلی تولید آفات توکسین از سوی فاکتورهای مختلفی مثل ویژگی‌های ژنتیکی قارچ‌های مولد و محیط فیزیکی‌شیمیایی که در آن رشد می‌کنند، تحت تأثیر قرار می‌گیرد.

در تحقیقی که از سوی Najafi و همکاران روی نمونه‌های پسته صورت گرفت، با استفاده از ژن تنظیمی مسیر بیوسنتز آفات توکسین (*aflR*)، PCR اختصاصی به منظور شناسایی جدایه‌های توکسین‌زا به کمک دو آغازگر 1. *aflR* و 2. *aflR* انجام شد، که

سپاسگزاری

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

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

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

References

- Panahi B, Khezri M. Effect of harvesting time on nut quality of pistachio (*Pistacia vera* L.) cultivars. *Sci Hort.* 2011;129(4):730-4. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.05.029>
- Cheraghali A, Yazdanpanah H, Doraki N, Abouhossain G, Hassibi M, Ali-Abadi S, et al. Incidence of aflatoxins in Iran pistachio nuts. *Food Chem Toxicol.* 2007;45(5):812-6. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.10.026> PMID:17161513
- Sedaghat R. Constraints in production and marketing of iran's pistachio and the policies concerned: An application of the garret ranking technique. *IJNRS.* 2011;2(1):27-30.
- Kabirian HR, Afshari H, Mohammadi Moghadam M, Hokmabadi H. Evaluation of pistachio contamination to *Aspergillus flavus* in Semnan provinc. *IJNRS.* 2011;2(3):1-6.
- Nazemi L, Kordbacheh P, Ghazvini RD, Moazeni M, Dana MA, Rezaie S. Effects of thiamine on growth, aflatoxin production, and aflR gene expression in *A. parasiticus*. *Curr Med Mycol.* 2015;1(1):26. <https://doi.org/10.18869/acadpub.cmm.1.1.26> PMID:28680978 PMID:PMC5490319
- Hajimohammadi B, Ehrampoush MH, Hashemi S, Khalatbari SL, Zare F, Taheri MS. [The effect of electron irradiation on aflatoxin B1 in pistachio production process inoculated with *Aspergillus flavus*.](https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.16.001) *Toloo e Behdasht.* 2017;16(2):1-8.
- Kman NE, Nelson RN. Infectious agents of bioterrorism: a review for emergency physicians. *Ann Emerg Med.* 2008;26(2):517-47. <https://doi.org/10.1016/j.emc.2008.01.006>
- Carlson MP, Ensley SM. Understanding fungal (mold) toxins (mycotoxins): Cooperative Extension, Institute of Agriculture and Natural Resources, University of Nebraska-Lincoln; 2003.
- Peraica M, Radić B, Lucić A, Pavlović M. Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bull World Health Organ.* 1999;77(9):754-66. PMID:10534900 PMID:PMC2557730
- Hua S-ST, Baker JL, Flores-Espiritu M. Interactions of Saprophytic Yeasts with anor Mutant of *Aspergillus flavus*. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65(6):2738-40. PMID:10347069 PMID:PMC91404
- Hua SST, Brandl MT, Hernlem B, Eng JG, Sarreal SBL. Fluorescent viability stains to probe the metabolic status of aflatoxigenic fungus in dual culture of *Aspergillus flavus* and *Pichia anomala*. *Mycopathologia.* 2011;171(2):133-8. <https://doi.org/10.1007/s11046-010-9352-z> PMID:20680685
- Flaherty JE, Payne GA. Overexpression of aflR lead to up regulation of pathway and increased Aflatoxin production in *A.flavus*. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63(10):3995-4000. PMID:16535712 PMID:PMC1389268
- Feng GH, Leonard TJ. Culture conditions control expression of the genes for aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus* and *A. nidulans*. *Appl Environ Microbiol.* 1998;64(6):2275-7. PMID:9603849 PMID:PMC106313
- Ehrlich KC, Montalbano BG, Cotty PJ. Sequence comparison of aflR from different *Aspergillus* species provides evidence for variability in regulation of aflatoxin production. *Fungal Genet Biol.* 2003;38(1):63-74. [https://doi.org/10.1016/S1087-1845\(02\)00509-1](https://doi.org/10.1016/S1087-1845(02)00509-1)

15. Calvo AM, Wilson RA, Bok JW, Keller NP. Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002;66(3):447-59. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.447-459.2002> PMID:12208999 PMCID:PMC120793
16. van Egmond HP, Schothorst RC, Jonker MA. Regulations relating to mycotoxins in food. *Anal Bioanal Chem.* 2007;389(1):147-57. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1317-9> PMID:17508207
17. da Gloria EM. Aflatoxin contamination distribution among grains and nuts. *Aflatoxins-Detection, Measurement and Control: InTech;* 2011.
18. Suanthie Y, Cousin MA, Woloshuk CP. Multiplex real-time PCR for detection and quantification of mycotoxigenic *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. *J Stored Prod Res.* 2009;45(2):139-45. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2008.12.001>
19. Shapira R, Paster N, Eyal O, Menasherov M, Mett A, Salomon R. Detection of aflatoxigenic molds in grains by PCR. *Appl Environ Microbiol.* 1996;62(9):3270-3. PMID:8795215 PMCID:PMC168121
20. Konietzny U, Greiner R. The application of PCR in the detection of mycotoxigenic fungi in foods. *Braz J Microbiol.* 2003;34(4):283-300. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822003000400001>
21. Bankole SA, Adebajo A. Mycotoxins in food in West Africa: current situation and possibilities of controlling it. *Afr J Biotechnol.* 2003;2(9):254-63. <https://doi.org/10.5897/AJB2003.000-1053>
22. Abd El-Aziz AR, Mahmoud MA, Al-Othman MR, Al-Gahtani MF. Use of selected essential oils to control aflatoxin contaminated stored cashew and detection of aflatoxin biosynthesis gene. *Sci World J.* 2015;2015. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/958192>
23. Gradziel TM, Wang D. Susceptibility of California almond cultivars to aflatoxigenic *Aspergillus flavus*. *HortScience.* 1994;29(1):33-5.
24. Calvo AM, Wilson RA, Bok JW, Keller NP. Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002;66(3):447-59. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.447-459.2002> PMID:12208999 PMCID:PMC120793
25. O'Brien G, Georgianna D, Wilkinson J, Yu J, Abbas H, Bhatnagar D, et al. The effect of elevated temperature on gene transcription and aflatoxin biosynthesis. *Mycologia.* 2007;99(2):232-9. <https://doi.org/10.1080/15572536.2007.11832583>
26. Diener UL, Davis ND. Limiting temperature and relative humidity for growth and production of aflatoxin and free fatty acids by *Aspergillus flavus* in sterile peanuts. *J Am Oil Chem Soc.* 1967;44(4):259-63. <https://doi.org/10.1007/BF02639271>
27. Şimşek O, Arıcı M, Demir C. Mycoflora of hazelnut (*Corylus avellana* L.) and aflatoxin content in hazelnut kernels artificially infected with *Aspergillus parasiticus*. *Mol Nutr Food Res.* 2002;46(3):194-6. [https://doi.org/10.1002/1521-3803\(20020501\)46:3<194::AID-FOOD194>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/1521-3803(20020501)46:3<194::AID-FOOD194>3.0.CO;2-D)
28. Mojtahedi H, Rabie C, Lübben A, Steyn M, Danesh D. Toxic aspergilli from pistachio nuts. *Mycopathologia.* 1979;67(2):123-7. PMID:481560
29. Rahimi P, Sharifnabi B, Bahar M. *Aspergillus* species isolated from pistachio and determination of their aflatoxin production. *Rostaniha.* 2007;8(1):30-42.
30. Mimoune NA, Riba A, Verheecke C, Mathieu F, Sabaou N. Fungal contamination and mycotoxin production by *Aspergillus* spp. isolated from nuts and sesame seeds. *JMBFS.* 2016;5(4):301. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2016.5.4.301-305>
31. Najafi AK. Detection of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* species producing aflatoxin in pistachio by molecular methods. [dissertation]. Tehran Iran: University of Tehran; 2009.
32. Rahimi P, Sharifnabi B, Bahar M. Detection of aflatoxin in *Aspergillus* species isolated from pistachio in Iran. *Journal of phytopathology.* 2008;156(1):15-20. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01312.x>
33. Pourebrahim N, Yavarmanesh M. A molecular method for identification of aflatoxigenic fungi in pistachio of Khorasan region (Gonabad and Feyzabad). *Iranian Food Science and Technology Research Journal.* 2015;12(2):318-29.
34. Panjehkeh N, Khodadadi F, Ahmadinejad M, Salari M, Aminae M. Detection of aflatoxigenic fungi in pistachio nuts by polymerase chain reaction. *Archives of phytopathology and plant protection.* 2012;45(2):133-7. <https://doi.org/10.1080/03235408.2010.493757>