رستنیها، جلد ۸ (۱)، ۱۳۸۶

# گونه‌های آسپرژیلوس جدا شده از میوه‌های پسته و بررسی تولید آفلاتوکسین در آن‌ها*

*Aspergillus* species isolated from pistachio and determination of their aflatoxin production

**پریسا رحیمی، بهرام شریف‌نبی**و مسعود بهار**

دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

دریافت: ۱۳۸۵/۳/۱۳ پذیرش: ۱۳۸۶/۱/۲۰

## چکیده

به منظور شناسایی گونه‌های آفلاتوکسین‌زای *Aspergillus* روی پسته، نمونه‌برداری از مناطق مختلف کشت پسته در کرمان، رفسنجان و اصفهان انجام گرفت. در این تحقیق بیش از ۲۵۰ جدایه به دست آمده از مناطق مختلف نمونه‌برداری و ۲۳ جدایه از مرکز تحقیقات پسته رفسنجان مورد مطالعه قرار گرفتند. جدایه‌های *Aspergillus* یافت شده، شامل گونه‌های *A. ochraceus*، *A. niveus*، *A. flavus*، *A. nige*، *A. tamari*، *A. candidus*، *A. alliaceus*، *A. parasiticus*، *A. terreus*، *A. unguis* و *A. wentii* بودند. گونه‌های *A. unguis*، *A. alliaceus* و *A. wentii* برای اولین بار از ایران گزارش می‌شوند. برای تعیین جدایه‌های آفلاتوکسین‌زا، کلیه جدایه‌ها در محیط کشت YES کشت و با روش TLC مورد ارزیابی قرار گرفتند. در بین جدایه‌هایی که مورد بررسی قرار گرفتند تنها جدایه‌های *A. parasiticus* و نیمی از جدایه‌های *A. flavus* قادر به تولید آفلاتوکسین بودند. به منظور بررسی ارتباط بین تولید آفلاتوکسین با سختینه‌زایی، جدایه‌های *A. flavus* در محیط کشت Czapek کشت شدند، اما ارتباط مستقیمی بین تولید آفلاتوکسین و تشکیل سختینه یافت نشد. به منظور بررسی کارایی ماده متیل بتاسیکلودکسترین در ردیابی آفلاتوکسین، جدایه‌ها در محیط کشت عصاره مخمر سوکروز آگار، دارای ۰/۳ درصد از این ماده کشت و بعد از سه روز با دستگاه ژل داکیومنت برای مشاهده

تشعشع فلورسنت مورد آزمایش قرار گرفتند. این ماده قادر بود تمام جدایه‌های آفلاتوکسین‌زا را ردیابی کند.

**واژه‌های کلیدی:** گونه‌های آسپرژیلوس، آفلاتوکسین، متیل بتاسیکلودکسترین، پسته

**مقدمه**

با توجه به این که سطح نسبتا وسیعی از کشور در مناطق کویری واقع شده است و دارای شرایط نامساعدی مانند شوری آب و خاک، خشکی و کم آبی می‌باشد، کشت پسته به عنوان یک گیاه مقاوم بسیار مورد توجه قرار دارد (Shibani *et al.* 1995). بر اساس گزارش سازمان خواروبار و کشاورزی جهانی (FAO)، ایران با ۳۱۰۰۰۰ تن (۵۸ درصد تولید کل دنیا)، ترکیه با ۸۵۰۰۰ تن (۱۶ درصد کل)، ایالت متحده آمریکا با ۵۳۰۰۰ تن (۱۰ درصد کل)، سوریه با ۵۰۰۰۰ تن (۹ درصد کل) و چین با ۲۶۰۰۰ تن (۵ درصد کل) پنج تولید کننده بزرگ پسته در سال ۲۰۰۴ بودند (WHT 2004).

پسته به عنوان یک محصول مهم صادراتی در طول دوره کشت و مراحل مختلف فرآوری، مورد حمله قارچ‌های گوناگون قرار می‌گیرد. از جمله این قارچ‌ها، گونه‌های مختلف *Aspergillus* می‌باشند که علاوه بر خسارت ظاهری به میوه پسته، با تولید متابولیت‌های ثانویه‌ای چون مایکوتوکسین‌ها، از ارزش غذایی و صادراتی این محصول می‌کاهند. در بین مایکوتوکسین‌ها، آفلاتوکسین به دلیل اثرات مختلف بیوشیمیایی و بیولوژیکی بیش از همه مورد توجه می‌باشد. از سال ۱۹۷۱ که کشور ایالت متحده آمریکا مقداری از پسته‌های صادراتی ایران را به دلیل آلودگی به آفلاتوکسین توقیف نمود، موضوع آلودگی پسته‌های ایران به این توکسین مورد توجه قرار گرفت و *مجتهدی* و همکاران (Mojtahedi *et al.* 1979, Mojtahedi *et al*. 1980) در این زمینه شروع به تحقیق کردند و از مناطق مختلف کشت پسته ایران نمونه‌برداری کردند. *مجتهدی* و همکاران (۱۹۷۹)، ۱۳ گونه آسپرژیلوس شامل *A. tamarii* ،*A. fischeri* Wehmer ،*A. flavus* Link ،*A. niger* Van Tiegh. Bainier & Sartory ،*A. nidulans* (Eidam) G. Winter ،*A. terreus* Thom ،Kita (Bain & Sart.) Thom & Church ،*A. versicolor* (Vuill.) Tiraboschi ،*A. umbrosus* و *A. fumigatus* Fres. ،*A. petrakii* Vörós-Felkai ،*A. ochraceus* G. Wilh. ،*A. sydowii* *A. parasiticus* Speare را از میوه‌های پسته گزارش نمود. بر اساس این تحقیق، فلور قارچ اصلی روی میوه پسته آسپرژیلوس و گونه غالب *A. niger* معرفی شد. *حیدریان* و همکاران (Heidarian *et al.* 2005) به تازگی گونه‌های *A. phoenicis* (Corda) Thom & Currie و*A. puniceus* Known - Chung & Fennell را به فهرست گونه‌های آسپرژیلوس روی میوه‌های

پسته ایران اضافه کردند. از بین گونه‌های آسپرژیلوس گزارش شده از روی پسته، تنها دو گونه *A. flavus* و *A. parasiticus* به عنوان مهم‌ترین تولید کنندگان آفلاتوکسین مورد توجه قرار دارند. تا کنون روش‌های مختلفی، شامل روش‌های کروماتوگرافی (کروماتوگرافی لایه نازک و کروماتوگرافی مایع با فشار بالا)، روش‌های ایمنوشیمیایی (الایزا، ستون ایمنی سنجی و ایمنی سنجی رادیواکتیو)، روش‌های مولکولی (واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز) و استفاده از محیط کشت‌های اختصاصی برای ردیابی آفلاتوکسین به کار گرفته شده است (Smith & Moss 1985, Gilbert & Anklam 2002). توانایی ماده متیل بتاسیکلودکسترین در ردیابی آفلاتوکسین، توسط *فنت* (Fente *et al*. 2001) گزارش شد. این ماده از تاثیر آنزیم سید ترانس گلیکولاز بر روی دکستران تولید می‌شود و با واکنش با آفلاتوکسین سبب افزایش خاصیت فلورسنت آن در زیر نور فرا بنفش با طول موج ۳۶۰ نانومتر می‌گردد.

*اگال* و همکاران (Egal *et al.* 1994)، *گایزر* و همکاران (Geiser *et al.* 2000) و *چانگ* و همکاران (Chang *et al.* 2001) با انجام تحقیقاتی بیان داشتند، رابطه مثبتی بین تولید سختینه و آفلاتوکسین وجود دارد. در ایران، *حدادیان* و همکاران (Hadadian *et al.* 2004) در بررسی ۲۰ جدایه سختینه‌زا و ۲۰ جدایه غیر سختینه زا، اعلام کردند ۱۱/۴۵ درصد از ۸۸/۵۵ درصد جدایه‌های اسکروت‌زا، سختینه نوع S تولید کردند. با انجام TLC مشخص شد این جدایه‌ها نسبت به جدایه‌های غیر سختینه‌زا، ۱۰ برابر آفلاتوکسین بیشتری تولید می‌کنند. هیچ کدام از جدایه‌های مورد بررسی توسط *حدادیان* و همکاران (۲۰۰۴) سختینه نوع L تولید نکرده بودند.

با توجه به اهمیت اقتصادی و بهداشتی آفلاتوکسین، هدف از انجام تحقیق حاضر شناسایی جدایه‌های آفلاتوکسین‌زا *Aspergillus* روی پسته‌های ایران و همچنین اتخاذ روشی سریع در ردیابی این جدایه ها در مراحل مختلف فراوری پسته می‌باشد.

## روش بررسی

### مواد گیاهی مورد استفاده

در شهریور ماه ۱۳۸۳، نمونه‌هایی از نخاله‌های ریخته شده در کنار باغ‌های پسته و نیز میوه‌های پسته مشکوک به آلودگی *Aspergillus* از باغ‌های پسته اصفهان، کرمان و رفسنجان جمع‌آوری شد. این نمونه‌ها شامل پسته‌های خشک ریخته شده پای درخت، پسته‌های با پوست شکاف خورده، بد شکل، دارای لکه در پوست و پسته‌هایی بود که از نوک سیاه شده بودند. نمونه‌ها با استفاده از دستکش یک بار مصرف، داخل کیسه‌های پلاستیکی مجزا قرار داده شد و پس از انتقال به آزمایشگاه، تا انجام جداسازی قارچ‌ها از پوسته نرم، پوسته سخت و مغز، درون یخچال نگهداری شدند.

نمونه‌برداری از ترمینال‌های پسته کرمان در زمستان ۸۳ انجام گرفت. نمونه‌برداری درون ترمینال‌ها در چندین بخش انجام گرفت. مرحله صفر (پسته‌های با پوست)، مرحله یک (پسته‌های ورودی به حوض آب)، مرحله دو (گوهای خروجی از خط زیر آبی)، مرحله سه (گوه‌ای حذف شده از خط اصلی بعد از سرریز)، مرحله چهار (پسته‌های ورودی به خشک‌کن خط زیر آبی)، مرحله پنج (پسته‌های رو آبی خروجی از حوض تر)، مرحله شش (پسته‌های خروجی از خشک کن، هنگام تخلیه برای میدان آفتابی)، مرحله هفت (روی میدان آفتابی) و مرحله هشت (انبار).

## جدا سازی گونه‌های آسپرژیلوس

برای جداسازی گونه‌های آسپرژیلوس از نمونه‌های پسته جمع‌آوری شده، از محیط کشت PDA استفاده شد. در این مرحله از دو روش زیر استفاده گردید:

در روش اول، میوه‌های پسته به مدت دو دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد ضدعفونی سطحی گردید و پس از شستشو با آب مقطر سترون، روی محیط کشت PDA قرار داده شدند. در روش دوم میوه‌های پسته توسط استریومیکروسکوپ از نظر وجود یا عدم وجود هاگ بررسی گردید و تعدادی از وزیکول‌های مورد مشاهده روی محیط PDA کشت گردیدند.

برای جداسازی قارچ‌ها از نخاله‌ها و پسته‌های انباری محیط کشت PDA، محیط مناسبی تشخیص داده نشد، چون با کشت نخاله‌ها در این محیط، باکتری‌ها و قارچ‌هایی نظیر گونه‌هایی از *Rhizopus* سریع‌تر از گونه‌های آسپرژیلوس رشد می‌کردند. از طرف دیگر، پسته‌های انباری نیز ظاهری سالم داشتند و ضدعفونی سطحی سبب حذف هاگ‌های سطحی می‌شد. لذا برای جداسازی قارچ‌ها از نخاله‌ها و پسته‌های انباری از محیط کشت AFPA (پپتون ۱۰ گرم، عصاره مخمر ۲۰ گرم، آمونیوم سیترات آهن ۰/۵ گرم، ۰/۰۰۲ پنتاکلرونیتروبنزن و ۱۵ گرم آگار) استفاده گردید. به منظور جداسازی قارچ‌ها، ۴۰ گرم از هر نمونه در یک ارلن حاوی آب پپتون یک در هزار سترون ریخته و به مدت ۳۰ دقیقه روی شیکر تکان داده شد. سپس یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون هاگ قارچ‌ها در شرایط سترون به تشتک پتری حاوی این محیط کشت اضافه گردید. تشتک‌های پتری مایه‌زنی شده در انکوباتور ۳۰ سانتی‌گراد نگهداری شدند.

## شناسایی گونه‌های آسپرژیلوس

برای شناسایی گونه‌های آسپرژیلوس از سه محیط کشت MEA (۲۰ گرم عصاره مالت، یک گرم پپتون، ۲۰ گرم گلوکز و ۲۰ گرم آگار)، CYA (یک گرم دی پتاسیم هیدروژن فسفات،

۱۰ میلی‌لیتر زاپک غلیظ، ۳۰ گرم سوکروز و ۱۵ گرم آگار) و CY20S (یک گرم دی پتاسیم هیدروژن فسفات، ۱۰ میلی‌لیتر زاپک غلیظ، پنج گرم عصاره مخمر، ۲۰۰ گرم سوکروز و ۱۵ گرم آگار) استفاده شد. پس از جداسازی و خالص نمودن گونه‌های آسپرژیلوس، به منظور شناسایی آن‌ها، از چهار تشتک پتری شامل دو عدد محیط CYA، یکی حاوی MEA و دیگری محیط کشت CY20S استفاده شد. در هر تشتک پتری در سه نقطه دور از هم جدایه قارچ مورد نظر کشت گردید. یک محیط کشت CYA حاوی قارچ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و بقیه محیط‌ها در دمای ۲۵ سانتی‌گراد در تاریکی نگهداری شدند و رشد قارچ در همه تشتک‌ها بعد از یک هفته بررسی شد. برای تشکیل فرم جنسی قارچ لازم بود تا محیط کشت‌ها یک هفته دیگر هم درون انکوباتور نگهداری شوند. در برخی موارد برای تولید آسکوسپور مدت نگهداری طولانی‌تر بود و تا یک ماه هم به طول انجامید. قطر پرگنه‌های جدایه‌های آسپرژیلوس بعد از هفت روز از پشت تشتک پتری اندازه‌گیری شد. رنگ کنیدیوم‌ها، عمق، ساختار، نحوه چین‌خوردگی پرگنه و حضور یا عدم حضور قطراتی روی پرگنه و رنگ آن‌ها با چشم غیرمسلح از جمله شاخص‌های مورد ارزیابی بودند.

در تشخیص جدایه‌های آسپرژیلوس به دست آمده از پسته‌ها، از کلید شناسایی *کلیچ* و *پیت* (Klich & Pitt 1988) استفاده شد که در آن طول کنیدیوفور، اندازه و شکل وزیکول، متولا، فیالید،کنیدیوم، آسکوکارپ و آسکوسپورها مهم می‌باشند. لذا در مورد هر جدایه، حداقل ۲۵ اندازه‌گیری انجام گرفت و میانگین آن‌ها محاسبه شد.

وضعیت سطح کنیدیوم‌ها از نظر صافی و زبری و نیز شیاردار یا خاردار بودن در بررسی جدایه‌ها مورد تاکید قرار گرفت. تولید سلول‌های Hülle (سلول‌هایی کروی تا سوسیسی شکل با دیواره ضخیم) که در برخی از گونه‌ها با آسکوکارپ مرتبط هستند، از جمله موارد یادداشت‌برداری شده در این تحقیق بود. طی بررسی قارچ‌ها، وضعیت پایه وزیکول‌ها از نظر طول، ضخامت دیواره، رنگ و صاف و زبر بودن دیواره، داشتن فیالید یا متولا و یا ترکیبی از هر دو نیز مورد توجه قرار گرفت. تشکیل آسکوکارپ در بین جدایه‌های مورد بررسی تنها در گونه *A. nidulance* مشاهده شد.

### بررسی توانایی تولید سختینه

به منظور تعیین توانایی تولید سختینه قارچ‌های به دست آمده، جدایه‌های مورد نظر در محیط کشت Czapek و nitrate sodium ۳ درصد + Czapek کشت داده شدند و به مدت یک ماه درون انکوباتور در دمای ۲۸ سانتی‌گراد در تاریکی نگهداری گردید

**استفاده از ماده متیل بتاسیکلودکسترین در محیط کشت برای ردیابی آفلاتوکسین**

به منظور تعیین کارایی ماده متیل بتاسیکلودکسترین در ردیابی آفلاتوکسین، مقدار ۰/۳ گرم از این ماده (Sigma, C4555) در آب مقطر سترون حل شد و با استفاده از فیلتر ۴۵ میکرومتری سترون گردید. ماده مزبور به ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت YES agar حاوی ۱۵ گرم سوکروز، دو گرم عصاره مخمر و دو گرم آگار، اضافه گردید و درون تشتک پتری ریخته شد. جدایه‌های آسپرژیلوس در این محیط، کشت و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و تاریکی نگهداری شدند. محیط کشت‌ها در طول ۱۰ روز به طور مداوم بررسی شدند تا تاثیر زمان بر میزان اثر این ماده مشخص شود. بدین منظور با استفاده از دستگاه Gel Document Vilber Lourmat TCP-20-M تشعشع فلورسنت در اطراف پرگنه‌های رشد کرده، زیر نور ماورا بنفش با طول موج ۳۶۰ نانومتر بررسی شد.

**کروماتوگرافی لایه نازک**

به منظور تایید نتایج حاصل از به کارگیری متیل بتاسیکلودکسترین و ردیابی آفلاتوکسین در جدایه‌های *Aspergillus* از روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) توصیه شده در AOAC (Association of Official Analytical Chemists) استفاده گردید (Karunyavanij 1989). مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع YES درون لوله‌های آزمایش ریخته شد و سترون گردیدند. کلیه جدایه‌های *A. flavus* و *A. parasiticu*، همچنین تعدادی جدایه از سایر گونه‌ها، در زیر لامینار ایر فلو در این محیط‌های مایع کشت گردید و به مدت یک هفته در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در تاریکی نگهداری شدند. سپس به لوله‌ها مقدار ۱۰ میلی‌لیتر کلروفرم اضافه گردید. پس از تشکیل دو فاز، فاز شفاف زیری به لوله‌های آزمایش سترون که با استون شسته شده بودند، منتقل گردید. لوله‌ها درون حمام آب گرم ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا کلروفرم به صورت کامل تبخیر شود. باقی مانده محلول در ۵۰ میکرولیتر متانول خالص (Merk) حل گردید و درون ویال‌های سترون در یخچال نگهداری شد (Chang 2004).

صفحه سیلیکاژل (Merck KGaA, cat. No. 1.05721.0001) در محل مناسبی قرار داده شد و برای جلوگیری از تاثیر کناره‌ای، ۰/۵ سانتی‌متر از لبه‌ها و پنج سانتی‌متر از بالای صفحه با کاردک جدا گردید. با استفاده از خط کش، از فاصله سه سانتی‌متر از پایین صفحه، فواصلی یک سانتی‌متری از هم علامت گذاری شدند. نمونه‌های حل شده در متانول به مقدارهای ۲/۵، ۵ و ۱۰ میکرولیتر با استفاده از میکرو سورنگ همیلتون روی نقاط علامت‌گذاری شده تزریق گردید، به نحوی که نقاط کوچکی از نمونه‌ها ایجاد شود.

در کنار نمونه‌ها از استاندارد آفلاتوکسین (aflatoxin mix kit. 5amp/1ml. Supelco, INC. 16823) هم لکه‌گذاری شد. بافر شستشو به مقدار ۸۸ میلی‌لیتر کلروفرم و ۱۲ میلی‌لیتر متانول تهیه و درون تانک شستشو ریخته شد، به نحوی که فقط کف ظرف را بپوشاند. صفحه کروماتوگرافی درون تانک قرار گرفت تا بافر از آن شروع به بالا رفتن نماید و به زیر خطی که در بالای صفحه کشیده شده بود، برسد. در این مرحله صفحه از تانک بیرون آورده شد تا حلال در معرض هوا تبخیر شده و صفحه خشک شود. سپس با استفاده از دستگاه Gel document Vilber Lourmat TCP-20-M عکسبرداری انجام شد.

## نتیجه و بحث

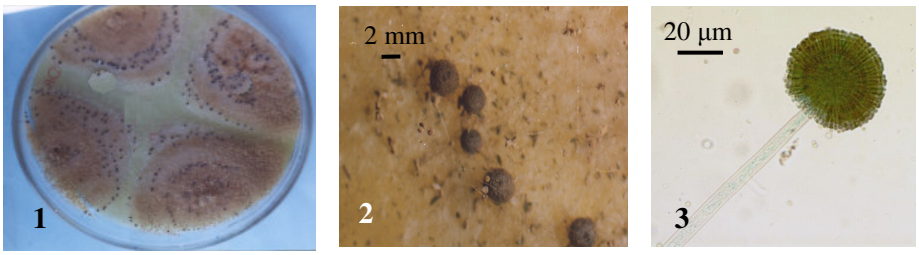
### شناسایی گونه‌های آسپرژیلوس

در این تحقیق 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 آمد. بر اساس مطالعات مورفولوژیکی، ۱۷۰ جدایه از قارچ‌های جداسازی شده، متعلق به گونه‌های مختلف *Aspergillus* بودند. گونه‌های *A. alliaceus*، *A. candidus*، *A. flavus*، *A. niger*، *A. niveus*، *A. ochraceus*، *A. parasiticus*، *A. tamari*، *A. terreus*، *A. unguis* و *A. wentii* از میوه‌های پسته جدا گردید. 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. در بررسی‌های مرفولوژیک انجام شده، در هیچ یک از گونه‌ها به جز *A. nidulance* کلیستوتسیوم تشکیل نشد، کلیستوتسیوم‌های زرد رنگ این گونه با سلول‌های Hülle پوشانده شده بود. در ذیل گونه‌های جدید *Aspergillus* شناسایی شده از ایران شرح داده می‌شود.

**۱- *A. alliaceus* Thom & Church, Can. J. Bot. 50: 2623**

این قارچ بعد از گذشت هفت روز روی محیط کشت CYA، پرگنه‌ای به قطر شش تا هفت سانتی‌متر، با رنگ تحتانی خرمایی یا قهوه‌ای متمایل به زرد، میسلیوم‌های سفید و کنیدیوم‌های زرد تا کهربایی تولید می‌نماید (شکل ۱-۱). بعد از گذشت یک هفته، سختینه‌های خاکستری تیره در بافت قارچی دیده می‌شود (شکل ۱-۲). به جز رنگ طلایی‌تر کنیدیوم‌ها، سایر خصوصیات پرگنه روی محیط کشت CY20S مشابه CYA است. در محیط کشت MEA رنگ پرگنه از پشت، زرد بی‌رنگ و هاگدهی پراکنده‌تری دارد. در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قطر پرگنه، ۵۵-۲۴ میلی‌متر و هاگدهی نسبت به سایر محیط کشت‌ها متراکم‌تر و بیشتر است. سرهای کنیدیومی بزرگ، شعاعی و دو ردیفه و سرهای کوچک‌تر اغلب ستونی و تک ردیفه می‌باشند (شکل ۱-۳). این گونه وزیکول‌های کروی تا گلابی شکل با قطری برابر ۵۰-۲۰

میکرومتر و پایه بی‌رنگ تولید می‌نماید. متولا (۱۲-۶ × ۵-۲/۵ میکرومتر) و فیالید (۹-۶ × ۳/۵-۳ میکرومتر) نیمه بالایی وزیکول را می‌پوشانند. این گونه کنیدیوم‌هایی با دیواره صاف، نیمه‌کروی تا تخم‌مرغی، با قطر ۳/۵-۳ میکرومتر تولید می‌نماید. این گونه با رشد سریع روی محیط کشت MEA، کنیدیوم‌های زرد طلایی و سختینه‌های تیره از بقیه گونه‌ها متمایز می‌باشد.

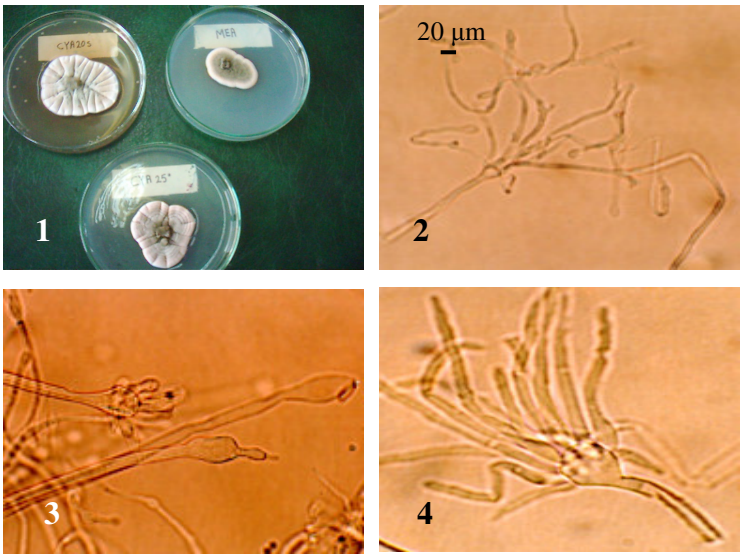



شکل ۱ - *A. alliaceus* (جدایه A1): ۱ و ۲- تولید سختینه‌های تیره بعد از یک هفته، ۳- وزیکول دو ردیفه.

Fig. 1. *A. alliaceus* (isolate No. A1): 1 & 2. sclerotia after one week, 3. biserriate aspergillum.

**۲- *A. unguis* (Weill & L. Gaudin) Thom & Raper. Medical Mycol.: 637, 1934**

در هر دو دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد، پرگنه‌هایی با قطر کم‌تر از ۳۰ میلی‌متر تولید می‌کند. رنگ پرگنه از پشت بی‌رنگ یا قهوه‌ای تیره دیده می‌شوند. میسلیوم‌ها سفید و کنیدیوم‌ها سبز/خاکستری تا سبز، به مقدار فراوانی وجود دارند (شکل ۲-۱). سرهای کنیدیومی در CYA شعاعی و در MEA ستونی با پایه‌ای با دیواره ضخیم هستند. وزیکول‌های قاشقی در این گونه ۱۶-۴ میکرومتر قطر دارند. در این گونه آسپرژیلا دو ردیفه، متولا ۷-۵ × ۴-۳ میکرومتری نیمه بالایی وزیکول را می‌پوشانند که کنیدیوم‌های کوچک، ۳/۵-۳ میکرومتر قطر تولید می‌کند. ریسه‌های سترون سفید با دیواره ضخیم که از سرهای کنیدیومی خارج شده‌اند، در زیر بینوکولر قابل مشاهده هستند. وجود ریسه‌های سترون که از سرهای کنیدیومی خارج شده‌اند، مهم‌ترین مشخصه این گونه است (شکل ۲-۲). این گونه روی همه محیط کشت‌ها رشد کندی دارند.



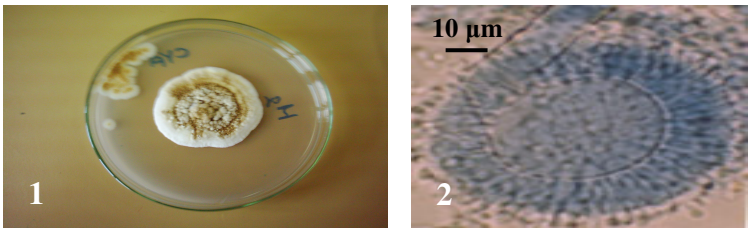

شکل ۲- *A. unguis* (جدایه U1): ۱- پرگنه قارچ روی سه محیط، ۲، ۳ و ۴- ریسه‌های سترون خارج شده از سرهای کنیدیومی.

Fig. 2. *A. unguis* (isolate No. U1): 1. colony on CYA, MEA & CY20S, 2, 3 & 4. white spicular hyphae rising above the conidial heads.

**۳- *A. wentii* Wehmer, Zentbl. Bakt. Parasitkde, Abt. II2: 150, 1896**

پرگنه روی CYA و MEA ۲۵-۳۵ میلی‌متر و روی CY20S ۵۰-۷۰ میلی‌متر قطر دارند. میسلیوم‌ها در این گونه فشرده، سفید تا زرد کم‌رنگ و کنیدیوم‌ها زرد خاکستری تا قهوه‌ای زیتونی هستند (شکل ۳-۱). ترشحات خارجی و رنگ زیر پرگنه بدون رنگ دیده می‌شوند. کنیدیوم‌زایی در CY20S کمتر بوده ولی در MEA کنیدیوم‌ها به رنگ زرد زیتونی دیده می‌شوند. این گونه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد رشد نمی‌کند.

سرهای کنیدیومی شعاعی، وزیکول‌ها کروی ۵۰-۷ میکرومتر، آسپرژیلا دو ردیفه،



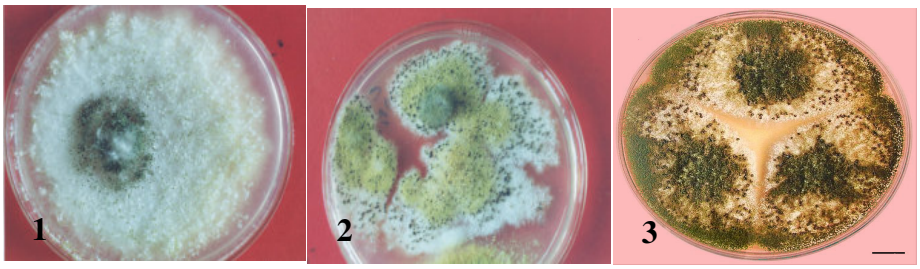

شکل ۳- *A. wentii* (جدایه H2): ۱- پرگنه در CYA، ۲- وزیکول.

Fig. 3. *A. wentii* (isolate No. H2): 1. colony on CYA, 2. aspergillum.

متولاها ۱۸-۱۰ × ۶-۵ میکرومتر، بسیار فشرده، بیشتر سطح وزیکول را می‌پوشانند. این گونه کنیدیوم‌های کروی تا استوانه‌ای چهار تا پنج میکرومتری تولید می‌کند. این گونه با کنیدیوم‌های قهوه‌ای زیتونی روی توده میسلیوم‌های فشرده سفید تا زرد و عدم رشد در ۳۷ درجه سانتی‌گراد از بقیه گونه‌ها متمایز می‌شود (شکل ۳-۲).

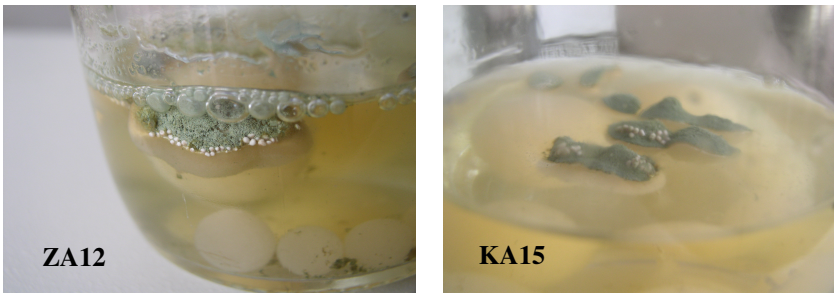
### تولید سختینه در جدایه‌های *A. flavus*

جدایه‌های *A. flavus* در محیط کشت Czapeck agar و Czapeck agar + ۳ درصد نیترات سدیم کشت شدند. بعد از گذشت یک ماه، جدایه‌های A4، E1، E2، H1، N3، N4، N9، N11، R5، R7، S4، S5،S9، X10 و U5 در محیط کشت Czapek و جدایه‌های X12، X13 در محیط Czapek + ۳ درصد نیترات سدیم، سختینه تولید کردند (جدول ۱). دو جدایه ZA12 و KA15 بعد از گذشت یک هفته در محیط کشت مایع PDB (عصاره ۴۰ گرم سیب‌زمینی و ۲۰ گرم دکستروز در یک لیتر آب) سختینه تولید کردند (شکل ۵). چنین حالتی در هیچ یک از جدایه‌های دیگر دیده نشد. جدایه ZA12 حتی در محیط PDA نیز سختینه تولیدکرد، ولی در جدایه KA15 چنین حالتی دیده نشد. تاکنون گزارشی از تولید سختینه در محیط کشت مایع و PDA نشده است. احتمال دارد این تفاوت در توانایی اسکلرت‌زایی در محیط کشت‌های متفاوت، مربوط به نیاز به مواد غذایی متفاوت جدایه‌های *A. flavus* باشد. این مورد، نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد. بر این اساس فقط ۱۰ درصد از جدایه‌های *A. flavus* جمع‌آوری شده قادر به تولید سختینه بودند. جمعیت جدایه‌های S (کوچک‌تر از ۳۰۰ میکرومتر) بسیار پایین بود. به جز جدایه H1 و ZA12 و سه جدایه X10، X12 و X13 از مرکز تحقیقات پسته رفسنجان، بقیه جدایه‌ها سختینه S تولید نکردند (شکل ۴).




شکل ۴ - انواع سختینه دهی قارچ‌های *Aspergillus flavus*: ۱- جدایه X12، سختینه‌های فراوان که بعد از گذشت یک ماه هنوز سیاه نشده‌اند، ۲- جدایه ZA12، سختینه‌های فراوان و سیاه، ۳- جدایه N11، سختینه‌های بزرگ کروی و سیاه.

Fig. 4. Different types of sclerotia production in *Aspergillus flavus*: 1. isolate No. X12, numerous sclerotia after one month, 2. isolate No. ZA12 with numerous black sclerotia, 3. isolate No. N11 big spherical and black sclerotia.




شکل ۵ - تولید سختینه جدایه‌های KA15 و ZA12 در محیط مایع PDB.
Fig. 5. Sclerotia of isolates No. KA12 and ZA12 in liquid medium PDB.

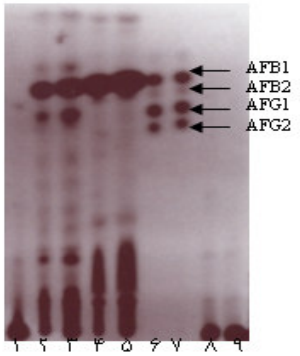
جدول ۱- شکل و اندازه سختینه در جدایه‌های *A. flavus*

| جدایه | اندازه و شکل سختینه | جدایه | اندازه و شکل سختینه |
|---|---|---|---|
| A4 | کروی، ۷۵۰ میکرومتر | R7 | استوانه‌ای، ۸۵۰-۴۲۰ میکرومتر |
| E1 | تقریبا کروی، ۸۳۳-۶۶۰ میکرومتر | S5 | سوسیسی شکل، ۶۳۵ میکرومتر سوسیسی |
| E2 | قلوه‌ای شکل، ۶۴۱-۴۹۸ میکرومتر | | شکل، ۶۴۰ میکرومتر |
| H1 | تقریبا کروی،۲۹۶ میکرومتر | X10 | کروی، ۳۰۰ میکرومتر |
| N3 | استوانه‌ای، ۵۶۰ میکرومتر | X12 | تقریبا کروی، نرم و سفید، ۳۸۶-۳۴۵ میکرومتر |
| N4 | استوانه‌ای، ۸۹۰ میکرومتر | X13 | کروی، ۳۹۲ میکرومتر |
| N9 | استوانه‌ای، ۶۲۰ میکرومتر | ZA12 | تقریبا کروی، ۳۹۵-۳۲۷ میکرومتر |
| N11 | کروی، ۸۱۵ میکرومتر | R5 | کروی تا کشیده، ۶۵۰-۴۹۳ میکرومتر |

## کروماتوگرافی لایه نازک

آفلاتوکسین احتمالی استخراج شده از جدایه‌های مختلف *Aspergillus* در این پژوهش روی صفحات TLC تزریق گردید و سپس با دستگاه ژل داکیومنت از آن عکسبرداری شد. بدین منظور از حلال کلروفرم- استون (۷:۳) استفاده شد.

نتایج به دست آمده با کروماتوگرافی لایه نازک نشان داد از میان کلیه جدایه‌های تحت بررسی، تنها نیمی از جدایه‌های *A. flavus* و کلیه جدایه‌های *A. parasiticus* قادر به تولید آفلاتوکسین بودند. همچنین با توجه به نتایج TLC، ارتباطی بین تولید سختینه و تولید آفلاتوکسین یافت نشد (شکل ۶).



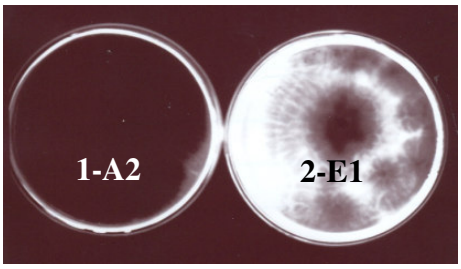

شکل ۶- صفحه TLC پس از عکسبرداری با UV: ۱، ۸ و ۹- جدایه‌های فاقد قدرت تولید آفلاتوکسین، ۲ و ۳- جدایه‌هایی که هر دو نوع آفلاتوکسین را تولید کردند، ۴ و ۵ - جدایه‌هایی که فقط آفلاتوکسین B را تولید کردند، ۶ و ۷ - آفلاتوکسین استاندارد به غلظت ۵۰۰ نانوگرم در میکرولیتر.

Fig. 6. TLC plate after UV visualization: 1, 8 & 9. non-aflatoxigenic isolates, 2 & 3. aflatoxin B and G, 4 & 5. only aflatoxin B, 6 & 7. standard of aflatoxin (500 ng/µl).

**استفاده از ماده متیل بتاسیکلودکسترین به عنوان یک شناسه آفلاتوکسین در محیط کشت**

عکسبرداری با دستگاه ژل داکیومنت و تطبیق نتایج با یافته‌های TLC نشان داد که جدایه‌های تولید کننده آفلاتوکسین، قادرند در محیط کشت حاوی متیل بتاسیکلودکسترین و تحت اشعه ماوراء بنفش، تلالو نشان دهند. در چنین شرایطی جدایه‌های فاقد توانایی تولید آفلاتوکسین هیچ گونه تلالویی نشان ندادند (شکل ۷). می‌توان چنین نتیجه گرفت که این روش ساده می‌تواند برای تشخیص سریع جدایه‌های دارای قدرت تولید آفلاتوکسین قارچ *A. flavus* به کار رود. هزینه کم و سادگی روش می‌تواند از مزایای این روش محسوب گردد. طی این آزمایش‌ها بهترین نتایج درخشندگی جدایه‌ها طی سه روز پس از کشت برآورد گردید که با نتایج *فنت* و همکاران (۲۰۰۱) که سه روز نگهداری محیط کشت در تاریکی ۲۸ درجه سانتی‌گراد را برای حصول نتیجه مطلوب کافی دانسته بود، مطابقت داشت.

با توجه به نتیجه مطلوب ماده متیل بتاسیکلودکسترین برای شناسایی جدایه‌های تولید کننده آفلاتوکسین *A. flavus*، می‌توان از این ماده در ردیابی سریع جدایه‌های تولید کننده آفلاتوکسین استفاده کرد.




شکل۷ -۱- جدایه A2 فاقد قدرت تولید آفلاتوکسین، ۲- جدایه E1 تولید کننده آفلاتوکسین.

Fig. 7. 1. Isolate No. A2 non-aflatoxigenic strain, 2. isolate No. E2 aflatoxigenic strain.

به طور کلی، در این تحقیق ۱۱ گونه مختلف *Aspergillus* از میوه‌های پسته جدا شدند که سه گونه *A. alliaceus*، *A. unguis* و *A. wentii* برای اولین بار از ایران گزارش می‌شوند. *A. parasiticus* و *A. flavus* مهمترین قارچ‌های تولید کننده آفلاتوکسین روی پسته هستند و سایر گونه‌های جدا شده از روی پسته قادر به تولید آفلاتوکسین نیستند. هر چند فراوانی جمعیت *A. flavus* بعد از *A. niger* بسیار بیشتر از سایر گونه‌ها بود، ولی تنها نیمی از جدایه‌های *A. flavus* قادر به تولید آفلاتوکسین بودند. از آن جایی که تعداد معدودی از جدایه‌ها سختینه تولید کردند، در این تحقیق ارتباطی بین تولید آفلاتوکسین و تشکیل سختینه یافت نشد. تطبیق نتایج حاصل از TLC و به کارگیری ماده متیل بتاسیکلودکسترین نشان داد، می‌توان از این ماده برای ردیابی سریع آفلاتوکسین در محیط کشت استفاده کرد. با توجه به اثر جدایه‌های فاقد توانایی تولید آفلاتوکسین در کاهش توانایی تولید آفلاتوکسین جدایه‌های آفلاتوکسین‌زا، تحقیق در این راستا می‌تواند کمکی موثر به کنترل بیولوژیکی گونه‌های مولد آفلاتوکسین نماید.

## سپاسگزاری

نگارندگان از زحمات آقای مهندس اصغر نکویی کمال سپاس را دارند.

## منابع

جهت ملاحظه منابع به متن انگلیسی مراجعه شود.

**نشانی نگارندگان**: پریسا رحیمی (parisa_rahimi2003@yahoo.com)، دکتر بهرام شریف‌نبی (sharifna@cc.iut.ac.ir) و دکتر مسعود بهار (mbahar@cc.iut.ac.ir)، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان.

# *ASPERGILLUS* SPECIES ISOLATED FROM PISTACHIO AND DETERMINATION OF THEIR AFLATOXIN PRODUCTION

**P. RAHIMI, B. SHARIFNABI* and M. BAHAR**
College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

Received: 03.06.2006 Accepted: 09.04.2007

Aflatoxins are the most serious problem in production and export of pistachio of Iran. They are amongst the most toxic mycotoxins and are produced predominantly by *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. Pistachio is susceptible to invasion by aflatoxigenic *Aspergillus* species and subsequent production of aflatoxins, during preharvesting, processing, transportation or storage. Various methods have been used to detect toxin in pistachio such as chromatography (TLC and HPLC), ELISA and PCR base methods. Some of these methods e.g. chromatography, are time consuming, labor-intensive and expensive. In this study, nuts sample of pistachio were collected from pistachio orchards in Kerman, Rafsanjan and Isfahan. Culture media AFPA and PDA, were used to isolate *Aspergillus* species. Two hundred and fifty isolates were obtained and based on microscopic and macroscopic studies, the isolates belonged to the genera, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Alternaria* and *Cladosporium*. Comparing morphological characters of *Aspergillus* species grown on CYA, CY20S and MEA after one week, 10 following *Aspergillus* species were identified:

* Corresponding author

*A. alliaceus*, *A. candidus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. niveus*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus*, *A. tamari*, *A. terreus*, *A. unguis* and *A. wentii*, that *A. alliaceus*, *A. candidus*, *A. niveus*, *A. unguis* and *A. wentii*, were reported for first time from pistachio in Iran. There was not a direct relationship between sclerotium and aflatoxin production in this study. Application of methylated ß-cyclodextrin in culture media showed that it can be used for rapid detection of aflatoxigenic aspergilli.

**Key words:** *Aspergillus* species, aflatoxin, methylated ß-cyclodextrin, pistachio

To observe the figures and table, refer to the Persian text.

**References**

CHANG, P.K., BENNETT, J.W. and COTTY, P.J. 2001. Association of aflatoxin biosynthesis and sclerotial development in *Aspergillus parasiticus*. Mycopathology 153: 41-48.

CHANG, P.K. 2004. Lack of interaction between AFLR and AFLJ contributes to nonaflatoxigenicity of *Aspergillus sojae*. J. Biotech. 107: 245-253.

EGAL, D.S., COTTY, P.J. and ELIAS, K.S. 1994. Relationships among isolates of *Aspergillus* sect. *flavi* that vary in aflatoxin production. Phytopathology 84: 906-912.

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

GEISER, D.M., DORNER, J.W., BRUCE, W.H, and TAYLOR, J.W. 2000. The phylogenetics of mycotoxin and sclerotium production in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae*. Fung. Genet. Biol. 31: 169-179.

GILBERT, J. and ANKLAM, E. 2002. Validation of analytical method for determining mycotoxins in food stuffs. Trends Analytic. Chem. 21: 468-486.

HADDADIAN, Z., MIRABOLFATHI, M.,EATEBARIAN, H.R. and ABOO HOSEIN, G. 2004. Relationship between aflatoxin and sclerotia production of *Aspergillus flavus* isolates from pistachio. Proceeding of 16th Iranian Plant Production Congress. 384p. (Abst.).

HEIDARIAN, R., JAVAN-NIKKHAH, M., ORMAZ, B. and PEYAMBARI, M. 2005. Study on fungal contamination of pistachio seeds in Kerman Province, Iran and some new fungi for Iranian pistachio mycoflora. IV International Symposium on Pistachio and Almond- ISHS- Tehran- Iran. 180p. (Abst.).

KARUNYAVANIJ, S. 1989. Factors affecting the TLC of aflatoxins analysis. Available at: www.fao.org/docrep/X5036E/x5036E0j.htm

KLICH, M.A. and PITT, J.I. 1988. A laboratory guide to the common *Aspergillus* species and their teleomorphs. North Ryde, NSW: CSIRO Division of Food Processing.

MOJTAHEDI, H., RABIE, C.J., LUBBEN, A., STEYN, M. and DANESH, D. 1979. Toxic *Aspergillu*s from pistachio nuts. Mycopathology 67(2): 123-127.

MOJTAHEDI, H., DANESH, D., HAGHIGHI, B. and FATHI, S. 1980. Storage relative humidity in Rafsanjan and impossibility of pistachio aflatoxicosis after nut processing. Iran. J. Plant Path. 16: 1-4 (in Persian with English summary).

SHIBANI, A., FARIVAR MAHIN, H. and VATANPOOR AZGHANDI, A. 1995. Pistachio and its production in Iran. Agriculture Research, Education & Extension Organization, Iranian Pistachio Research Institue.

SMITH, J.E. and MOSS, M.O. 1985. Mycotoxins: formation, analysis and significance. John Wiley & Sons. NY.

WORLD HORTICULTURE TRADE and U.S. EXPORT OPPURTUNITIES. 2004. World pistachio situation and outlook. Available at: www.fas.usda.gov/htp.

**Addresses of the authors:** P. RAHIMI (parisa_rahimi2003@yahoo.com), Former graduate student of Plant Pathology, Dr. B. SHARIFNABI (sharifna@cc.iut.ac.ir) and Dr. M. BAHAR (mbahar@cc.iut.ac.ir), College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan 8415683111, Iran.