(مقاله پژوهشی)

جداسازی گونه‌های مولدسم آفلاتوکسین براساس ردیابی ژن‌های *aflR* و *ver1* و شناسایی گونه با تعیین توالی‌های ITS در برنج مصرفی مشهد خراسان

حامد فراجی[1*]، فریده طباطبایی یزدی[2]، نعمت الله رزمی[3]

۱-دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی، دانشکده کشاورزی و فن آوری مدرن ، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران.

۲-استاد، گروه علوم وصنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

۳-استاد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده کشاورزی و فن آوری مدرن ، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران.

تاریخ دریافت:۱۴۰۱/۰۳/۱۱ تاریخ پذیرش:۱۴۰۱/۰۷/۲۵

DOI: 10.30495/jfst.2022.1959801.1801

چکیده

برنج یکی از غلات مهم و منابع اصلی انرژی مردم جهان است و به لحاظ مواد مغذی و رطوبت نسبی بالا در معرض آلودگی‌های قارچی می‌باشد. آفلاتوکسین کی‌از متابولیت‌های ثانویه قارچی بوده و جزء خطرناک‌ترین سموم سرطان‌زا می‌باشد؛ دسته‌ای از قارچ‌های مولدسم‌آفلاتوکسین‌به‌طوربالقوه‌می‌توانند‌در غلات و خشکبار به شدت خطرناک باشند. از مهمترین قارچ‌های تولید کننده آفلاتوکسین، آسپرژیلوس فلاووس وآسپرژیلوس پارازیتیکوس‌می باشد. در این تحقیق جداسازی و شناسایی گونه‌های مولد سم‌آفلاتوکسین از برنج بر اساس روش‌های کشت و مورفولوژی پروپاگول‌های‌قارچی صورت پذیرفت سپس ژن‌های *afl*R و *ver*1 که در بیوسنتز آفلاتوکسین نقش ساختمانی و تنظیمی دارند با پرایمر مخصوص‌تکثیرشده و عملیات الکتروفورز روی آن‌ها انجام شد و در نهایت جهت تایید روش مولکولی، اندازه‌گیری آفلاتوکسین با ستون‌های ایمونو افینیتی و دستگاه HPLC بر روی‌کشت‌های خالص جداسازی شده، انجام شد. نتایج‌نشان‌داد از ۶۰ نمونه‌جمع‌آوری شده، ۲۰ نمونه‌دارای قارچ‌های مولد آفلاتوکسین می‌باشند. ۲ نوع قارچ با خصوصیات مورفولوژیک مشابه آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس شناسایی شدند که توسط کشت روی محیط اختصاصی AFAP مورد تایید قرار گرفت. بر این اساس بررسی ژنهای ساختاری و تنظیمی مهم مانند *afl*R و *ver*1 جهت سنجش‌های اولیه حضور وآلودگی مواد غذایی مناسب و کارآمد بوده و پیشنهاد می‌گردد. تعیین توالی‌ITS نشان داد دوگونه‌آسپرژیلوس‌فلاووس Accession No MG430332.1 و آسپرژیلووس پارازیتیکوس Accession No MH937579.1 در برنج غالب هستند.

واژه‌های کلیدی: آفلاتوکسین، آسپرژیلوس، واکنش زنجیره ای پلیمراز.

*مسئول مکاتبات: hamed.0102@gmail.com

۱-مقدمه

باتوجه‌به‌این‌که‌برنج‌مستعدآلودگی‌بادسته‌ای از آسپرژیلوس‌های دارای چرخه بیوسنتز آفلاتوکسین می‌باشد و از آن‌جایی که جزمهمترین مواد در رژیم‌غذایی مردم آسیا از جمله ایران است می‌تواند خطرات فراوانی برای سلامت جامعه ایجاد کند و به دلیل رطوبت بالا و شرایط کشت در شالیزار در مقایسه با بقیه غلات‌خشک‌مثل‌گندم، مستعدرشد قارچ‌های‌مولد سم‌می باشد. براین‌اساس‌دربسیاری از مقالات‌به‌تولید آفلاتوکسین به صورت انبوه در راکتور اشاره شده است که نشان می‌دهد برنج از نظر مواد غذایی و ریز مغذی‌ها، کاملاً بستر ساز تولید آفلاتوکسین است. آفلاتوکسین‌ها به‌عنوان‌خطرناک‌ترین مایکوتوکسین‌های شناخته شده، جز رده یک مواد سرطان‌زا می‌باشند. در بین آسپرژیلوس‌ها،آسپرژیلوس‌فلاووس،آسپرژیلوس پارازیتیکوس و آسپرژیلوس‌نومیوس‌قادر به تولیدآفلاتوکسین هستند(۷).روش اصلی‌و معتبراندازه‌گیری‌میزان آفلاتوکسین HPLC[1] می باشد ولی به این دلیل که این روش هزینه بسیار بالایی دارد؛ ردیابی ژن‌های‌مهم‌دربیوسنتزآفلاتوکسین‌برای‌جداسازی آسپرژیلوس‌های مولدسم‌می‌تواندبسیارمقرون‌به‌صرفه‌وکارآمدباشد. آفلاتوکسین طی‌فرایندبیوسنتزپیچیده و چند مرحله‌ای تولید می‌شود نزدیک به۲۰۰ ژن در تولید آفلاتوکسین نقش دارند بعضی از این ژن‌ها مانندver1وafl Rبه لحاظ عملکرد اهمیت بیشتری دارند(۱۱). محصول‌ژنی ver1موجب‌تبدیل‌ورسیکولین۲به استریگماتوسیستین۳ می‌شودکه این ماده یکی از پیش سازهای انتهایی چرخه تولید آفلاتوکسین است. همچنین ژن afl R نقش تنظیمی در چرخه بیوسنتز آفلاتوکسین دارد و محصول آن یک پروتئین انگشت روی۴ متصل شونده به DNA می‌باشد؛ که با اتصال به DNA باعث کنترل فرایند تولید آفلاتوکسین می‌گردد(۵). بررسی دو ژن‌ساختاری‌ونظیمی‌کمک‌می‌کندتاتولید آفلاتوکسین بصورت دقیق‌تری ارزیابی شود (۵،۹). در تحقیقات ردی و همکاران، قارچ‌های‌توکسین‌زای‌برنج‌مصرفی‌هند مورد مطالعه قرار گرفت که‌نشان‌داد گونه‌های‌آسپرژیلوس‌زیادی‌می‌توانند‌دربرنج حضور داشته باشند و ارتباط بین‌گونه‌های توکسین‌زا و غیر توکسین‌زا راموردبررسی‌قرارداد(۳). جداسازی مولکولی آسپرژیلوس‌های مولدسم‌درقهوه‌درسال۲۰۰۵صورت‌گرفت‌که‌نشان‌داد گونه‌های غالب‌درقهوه،آسپرژیلوس‌فلاووس و آسپرژیلوس اکراسئوس۵ می‌باشندکه‌به‌ترتیب‌تولیدکننده‌آفلاتوکسینGوBو اکراتوکسین A هستند(۹). مطالعه انواع ژن‌های مشارکت‌کننده در تولید آفلاتوکسین شامل ژن‌های تنظیمی و ساختاری مانند ژن‌های ver 1، omt1، nor1 و aflR که توسط محققین زیادی انجام شده است؛ ضمن اینکه در این تحقیقات روش‌هایی برای شناسایی وتأییدتولیدسم‌توسط‌گونه‌های‌توکسین‌زاارائه گردیده است(۹).روش‌جداسازی‌مولکولی قارچ‌های مولد آفلاتوکسین می‌تواندجهت‌ارزیابی سریع آلودگی برنج و دیگر غلات مورد استفاده گسترده قرار گیرد. این مطالعه برای اولین بار بر روی برنج ایرانی صورت‌گرفت تا بتوان ضمن ارزیابی برنج از نظر قارچ‌های موجود و تولید توکسین در آن‌ها، روش مولکولی را باروش HPLCمقایسه‌نمود. هدف از انجام این تحقیق شناسایی مولکولی۲ژن‌مهم‌درتولید آفلاتوکسین در قارچ‌های جداسازی شده از برنج مصرفی مشهد می‌باشد تا بتوان به یک روش دقیق و سریع جهت غربالگری نمونه‌های غلات پی برد و با توجه به سرعت بالا و دقت زیاد روش مولکولی PCR می‌توان بر روی کل نمونه‌ها آزمون مولکولی انجام داد و فقط روی نمونه‌های مثبت، آزمون دقیق و گران قیمت HPLC را انجام داد.

۲-مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیه و نمونه برداری برنج

مجموعا ۶۰ نمونه برنج از مراکز فروش سطح شهر و بصورت تصادفی‌تهیه‌وباروش‌های‌استانداردملی‌شماره ۶۸۷۲ همگن‌سازی شد. دراین تحقیق از روش نمونه‌برداری کاملاً تصادفی استفاده شد وهیچ‌گونه‌آزمونی‌برای جداسازی یا ارزیابی اولیه آلودگی

1-High Performance Liquid Chromatography
2- Versicolin
3- Sterigmatocystin
4- Zinc Finger Protein

5-*Aspergillus ochraceus*

به قارچ صورت نپذیرفت. جامعه آماری این تحقیق شامل ۶۰ نمونه برنج ایرانی و وارداتی می‌باشد که دو سوم نمونه‌ها برنج ایرانی و بقیه انواع برنج پاکستانی بودند.

۲-۲-کشت قارچ

پس از تهیه سوسپانسیون اولیه و رقت‌های لازم، کشت روی محیط کشت‌عمومی DG18[1] حاوی آنتی بیوتیک کلرامفنیکل صورت پذیرفت، بعد از گذشت ۵ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، کلنی‌های کشت‌شده در پلیت ها، جهت خالص‌سازی وشناسایی آسپرژیلوس‌ها مورد استفاده قرار گرفتند(۹). براساس خصوصیات ظاهری، رنگ، شکل کلنی و اسپرانژیوم، کونیدی وساختارمیسیلیوم‌شناسایی‌اولیه‌انجام‌شد. براساس شکل ظاهری، از نوع و شکل آرایش‌اسپورهاکه‌درآسپرژیلوس‌فلاووس لبوله۲ و کاملاً انتهایی به صورت جدا از هم و تقریباً منظم می‌باشد و درآسپرژیلوس پارازیتیکوس به صورت نامنظم و دارای سطح مشجروکنگره دار دیده می‌شود استفاده گردید. همچنین رنگ کلونی‌درآسپرژیلوس فلاووس زرد تا قهوه‌ای با ظاهر ابریشمی دارای‌رشته‌های کونیدی با دیواره ضخیم تقریباً ناصاف، کروی یا بیضوی‌می‌باشددرحالی‌که‌درآسپرژیلوس‌پارازیتیکوس رنگ کلونی سبز تا سبز لجنی با ظاهرکاملاً غیر ابریشمی و کونیدی دارای حاشیه تزئین‌دار یا خاردار می‌باشد جداسازی صورت پذیرفت(۷). سپس از کلنی‌های تایید شده کشت خالص روی محیط‌کشت AFPA[3] تهیه‌گردید تا براساس تغییر رنگ محیط کشت شناسایی بهتری صورت پذیرد.

۲-۳-استخراج DNA از قارچ‌های جداسازی شده

برای استخراج DNA از اسپور قارچ‌های خالص‌سازی شده، بر روی محیط کشت BHI ۴ کشت داده شد و در دمای ۲۵ به مدت ۴۸ ساعت همراه با تکان دادن در ۲۰۰ دور در دقیقه، گرمخانه‌گذاری‌شد.درمرحله‌بعد ۵۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون جهت استخراج DNA طبق روش مبتنی بر تخریب دیواره‌ها با C-TAB[5]وشوک‌حرارتی‌وترسیب پروتئین‌ها بوسیله کلروفرم مورد استفاده قرارگرفت (۱۰). شستشوی DNA استخراجی طی چند مرحله با اتانول و ایزوپروپانول صورت پذیرفت تا به DNA ایی‌باکیفیت‌وخالص دست پیدا کرد.DNA استخراجی در محلول ۰/۱درصد بافر۶ TE حل شد و یک شبانه روز در دمای یخچال نگهداری شد تا از انحلال کامل آن اطمینان حاصل شود. DNA استخراج شده تا زمان انجام PCR[7] در دمای منفی ۲۰ درجه سلسیوس نگهداری شد(۶).

۲-٤-واکنشهای زنجیره ای پلیمرازی PCR

از ترمال‌سایکلر Bio Rad T-100 با قابلیت شیب دمایی برای PCR استفاده شد بهینه‌سازی دمای واسرشتگی با تکرار فرایند PCRانجام‌شد.PCRژن‌های aflR، ver 1 و ITS با پرایمرهای اختصاصی‌انجام‌گردیددرجدول۱توالی پرایمرها، تعداد بازهای آلی و درصد گوانین سیتوزین آورده شده است. مقادیر مورد نیاز مواد و محلول‌ها با توجه به اندازه، دمای ذوب پرایمرها و پیش‌بینی اندازه محصول نهایی بهینه‌سازی شده و در جدول ۲ با جزییات ارائه شده است. مشخصات دستگاه، چرخه و زمان لازم برای فرایند در جدول ۳ با جزییات ارائه شده است.

1-Dichloran 18% Glycerol Agar
2- Lobulated Spore
3-Asprgillus Flavous &Aspergillus Parasiticus Media

4-Brain Heart Infusion Broth
5-Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
6-Tris EDTA Buffer
7-Polymerase Chain Reaction

جدول ۱- توالی پرایمر ژن های *afl* R و*ver* 1 و ITS

Primer	Sequence	Base number	GC percent
*Ver*1(forward primer)	5 GCCGCAGGCCGCGGAGAAAGTGGT 3	24	50
Ver 1(reverse primer)	5 GGGGATATACTCCCGCGACACAGCC 3	23	40
afl R (forward primer)	5 TATCTCCCCCCGGGCATCTCCCGG 3	24	60
afl R (reverse primer)	5 CCGTCAGACAGCCACTGGACACGG 3	25	50
ITS1 (forward primer)	5 TCCGTAGGTGAACCTTGCGG 3	20	60
ITS4 (reverse primer)	5 TCCTCCGCTTATGATATGC 3	19	47

جدول۲ - غلظت و مقادیر مواد و واکنشگرها برای PCRژن‌های *afl* R و*ver* 1 و ITS

Reagent	Final concentration	Volume (ul)		
		ver 1	*aflR*	*ITS*
DNA	10-50 ng	3	4	5
Water	--	13.9	12.8	11.9
PCR Buffer(10x)	1x	2.5	2.5	2.5
$MgCl_2$ (25 mmol/lit)	1.5 mmol/lit	1.5	1.5	1.5
dNTP (10 mmol/lit)	0.8mmol/lit	2	2	2
Forward Primer	0.8mmol/lit	1	1	1
Reverse Primer	0.8mmol/lit	1	1	1
Taq DNA polymerase (5U/ul)	0.5 unit	0.1	0.2	0.1

جدول۳ - مشخصات چرخه ها و زمان های مورد نیاز برایPCR ژن های *afl* R و*ver* 1 و ITS

Steps	***ver1***	***aflR***	***ITS***
Annealing	10 min in 95 °C	10 min in 95 °C	5 min in 95 °C
Extension	30 sec in 95 °C	30 sec in 95 °C	45 sec in 94 °C
	30 sec in 59 °C	30 sec in 60 °C	45 sec in 61 °C
	60 sec in 72 °C	60 sec in 72 °C	60 sec in 72 °C
Number of cycle	30	35	38
Final elongation	3 min in 72 °C	3 min in 72 °C	3 min in 72 °C

محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز افقی، برند Bio Rad مدل EH-1013 جداسازی شدند. مشخصات ژل الکتروفورز شامل یک درصد آگار در بافر TBE[1] و دستگاه با ولتاژ ثابت ۱۰۰ ولت و زمان یک ساعت راه اندازی شد(۸). محصول PCR ۵۰۰ تا ۶۰۰ نوکلوتیدی برای ژن *afl* R[1] و ۲۰۰ نوکلوتیدی برای ژن *ver* 1 مورد انتظار می‌باشد. تعیین توالی به وسیله شرکت سیناژن روی محصولات PCR توالی ITS توسط دستگاه DNA Analysis AB Science انجام شد و مقایسه در بانک ژنی مرکز NCBI[2] صورت پذیرفت. برای تایید روش مولکولی و صحه‌گذاری بر حضور دو ژن aflR و *ver* 1 از روش اندازه‌گیری آفلاتوکسین به عنوان محصول اصلی این ژن‌ها، به‌وسیله ستون ایمونوافینیتی و HPLC استفاده شد. اندازه گیری آفلاتوکسین در کشت خالص قارچهای جداسازی شده پس از ۷ روز گرمخانه گذاری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس طبق استاندارد ملی ایران به شماره ۶۸۷۲ به شرح زیر انجام گردید: بعد از آسیاب نمونه‌ها و همگن‌سازی کامل، عبور از الک با منافذ ۸۵۰ میکرون جهت اطمینان از خرد شدن کامل دانه‌ها صورت گرفت. سپس مقدار مشخصی از نمونه توزین و بوسیله حلال مناسب استخراج انجام شد. بعد از رقیق سازی، با عبور مقدار معینی عصاره ازستون ایمیونوافینیتی مخصوص آفلاتوکسین‌های گروه B و G فرایند تخلیص صورت پذیرفت(۱۴). در پایان با تزریق نمونه‌ها و استانداردهای کاری، تعیین مقدار نهایی انجام شد.

٤- نتایج و بحث

از ۶۰ نمونه‌ای که فرایند جداسازی روی آن‌ها انجام شد، ۲۰ نوع قارچ با خصوصیات مورفولوژیک مشابه آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس قابل‌شناسایی بودند که فرایند تأیید، با کشت روی محیط اختصاصی AFAP صورت گرفت. حضور دو گونه غالب در بیشتر جداسازی‌های سایر محققین هم دیده شده است و گسترش این نوع قارچ‌های مولد سم، نشان دهنده توانایی تطبیق این گونه‌ها با شرایط محیطی می‌باشد. در بخش تأیید مولکولی با انجام PCR ژن‌های *afl*R و *ver1* متوجه شدیم سه مورد از سویه‌های جداسازی شده فاقد ژن‌های مورد نظر بودند و بر این اساس از فرایندهای بعدی مطالعه حذف شدند. یکی از جدایه‌های حذف شده تقریباً خصوصیات اصلی مورفولوژیک گونه آسپرژیلوس فلاووس را دارا بود این امر مبین این موضوع است که جداسازی و شناسایی بر اساس روش مورفولوژی شاید راهگشا و کم هزینه باشد ولی کامل و دقیق نیست و روش مولکولی ارزیابی ژنی می‌تواند با دقت و حساسیت بالا در تأیید گونه‌های توکسین‌زا مورد استفاده قرار گیرد. هم اکنون روش‌های مولکولی به سرعت در حال رشد و توسعه توسط دانشمندان و شرکت‌های تولید کیت و تجهیزات می‌باشند. با توجه به تحقیقات قبلی توسط مباشر و همکاران در سال ۲۰۱۳ دوگونه غالب مولد سم آفلاتوکسین در بیشتر غلات از جمله گندم و جو آسپرژیلوس فلاووس و با فراوانی کمتر آسپرژیلوس پارازیتیکوس می‌باشد، در تحقیق حاضر هم نتایج مشابهی به دست آمد(۱۱). در تحقیقات تاتانا و همکاران در سال ۲۰۱۷ ، گونه کاملا جدیدی از آسپرژیلوس جداسازی و شناسایی شد که قادر به تولید آفلاتوکسین در غلات می‌باشد؛ این گونه آسپرژیلوس کوروجنسیس[3] بوده وقادر است آفلاتوکسین‌های گروه B,G را تولید کند. بنابراین در شرایط خاص، گونه‌های دیگر هم‌می‌توانند سهمی درتولید آفلاتوکسین در غلات داشته باشند(۱۳). برخی از گونه‌ها که فقط آفلاتوکسین B1,B2 را تولیدکرده‌اند آسپرژیلوس فلاووس هستند و قارچ‌هایی که هر چهارنوع سم آفلاتوکسین‌راتولیدکرده‌اند، آسپرژیلوس پارازیتیکوس یا آسپرژیلوس نومیوس[4] هستند(۱). از میان سویه‌های جدا شده ۷۰/۵ درصد آسپرژیلوس فلاووس و تنها ۱۷/۷ درصد آسپرژیلوس پارازیتیکوس می‌باشند و بقیه جدایه‌ها توان تولید آفلاتوکسین

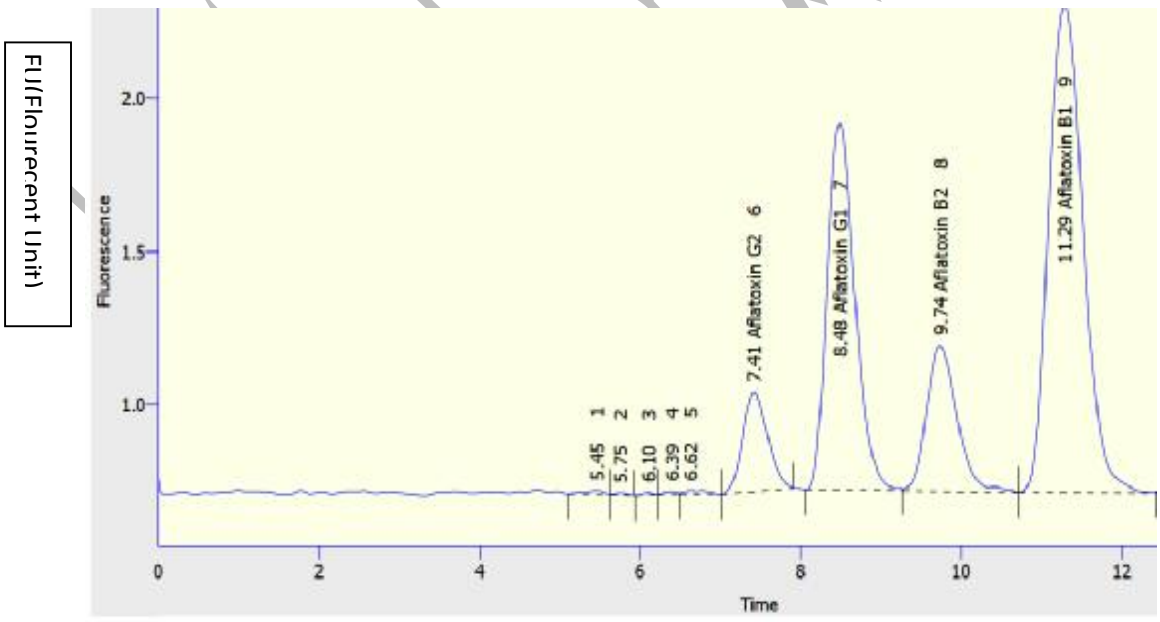
1- Tris-borate-EDTA
2 -National Center for Biotechnology Information

3- Aspergillus Chorogensis
4 -Aspergillus Nomius

را نداشتند. نتایج تعیین توالی نشان داد دو گونه آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس در برنج حضور دارند شناسه گونه‌ها، میزان تطابق و کد اختصاصی برای ردیابی در سایت NCBI و بانک ژنی در جدول ۴ نشان داده شده است. این یافته‌ها با مطالعه کشت‌های خالص و ریخت شناختی آن‌ها مورد تأیید قرار گرفت. همچنین از روی متابولیت‌های ثانویه تولید شده توسط این دو گونه (آفلاتوکسین‌های B، G) که به وسیله HPLC اندازه‌گیری‌شده‌بودند نتایج جداسازی مولکولی تأیید گردید بدین ترتیب که گونه آسپرژیلوس فلاووس تنها توان‌تولیدآفلاتوکسین‌های‌گروه‌Bرا دارد که در آنالیز HPLC فقط دو سم B2،B1 دیده شد و برای‌آسپرژیلوس‌پارازیتیکوس پارازیتیکوس‌دوگروه سم B، G شامل آفلاتوکسین‌های B1، B2، G1، G2 دیده شدند(۲،۱۳). نتایج تجزیه دستگاهی نشان‌دادسه‌سویه‌ازسویه‌های‌مشکوک‌به‌آسپرژیلوس پارازیتیکوس توان‌تولیدهر۴نوع‌سم‌آفلاتوکسین‌را دارا می‌باشند و بدین‌ترتیب از آن جا که تولید آفلاتوکسین‌های B1,B2,G1,G2 توسط آسپرژیلوس پارازیتیکوس انجام می‌شود(۱۲)، احتمال این‌که سویه‌های جداسازی شده آسپرژیلوس پارازیتیکوس باشند را تقویت می‌نماید.

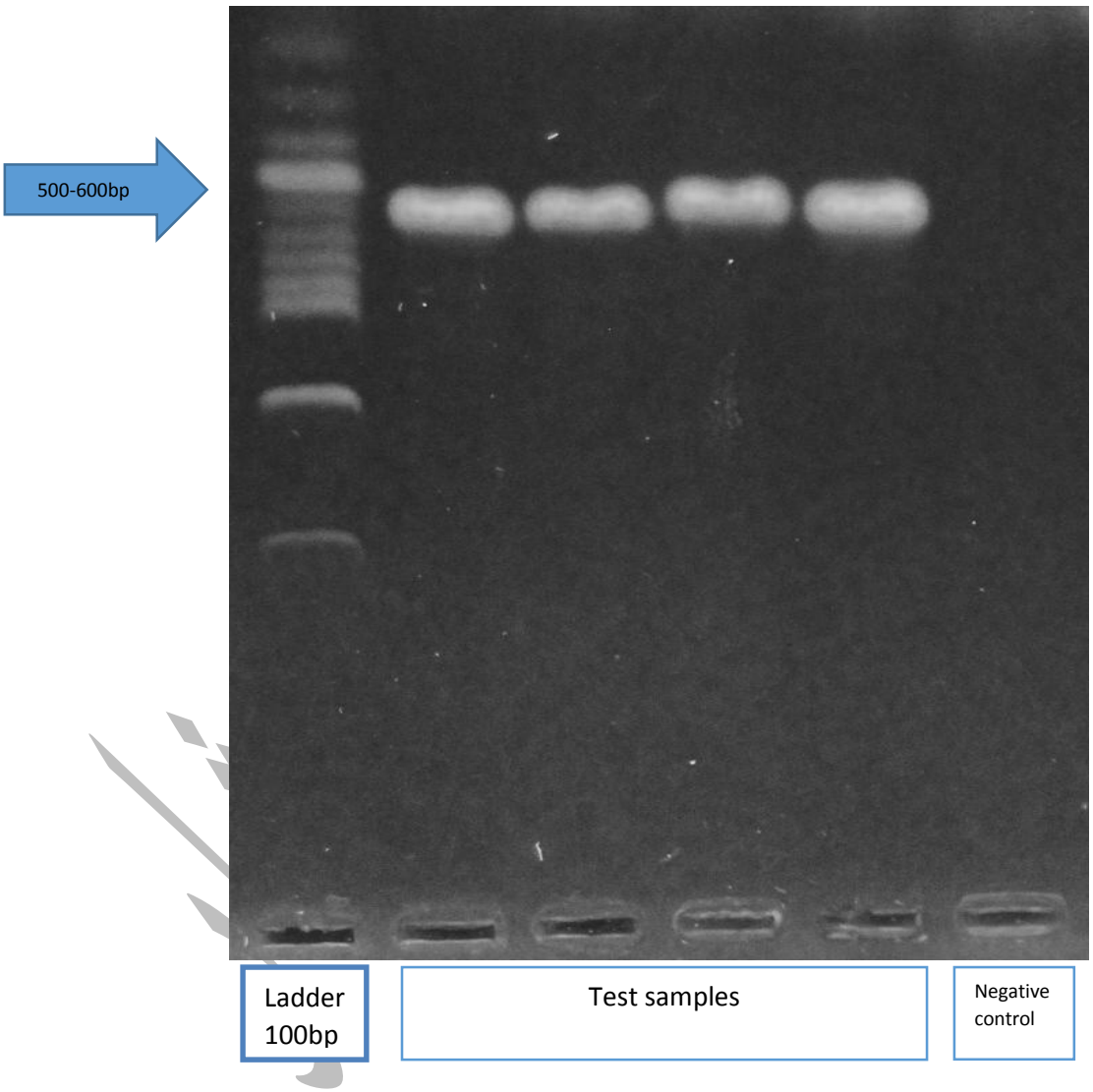
جدول ٤ – مشخصات گونه‌های جداسازی‌شده بر اساس توالی‌های ITS و مقایسه با بانک ژنی

ردیف	شناسه توالی	میزان تطابق (درصد)	جنس و گونه	شماره اختصاصی سویه
۱	TS-1	۹۹/۱۳	آسپرژیلوس فلاووس	MG430332.1
۲	TS-5	۱۰۰	آسپرژیلوس پارازیتیکوس	MH937579.1



شکل ۱– کروماتوگرام آفلاتوکسین‌های B,G : زمان ماند برای آفلاتوکسین‌های B1,B2,G1,G2

آزمون‌های مولکولی حضور ژنهای اختصاصی *ver 1 , afl R* در تمام نمونه‌هایی که توسط روش HPLC قادر به تولید آفلاتوکسین بودند تایید کرد در همان سه مورد که تولید سم دیده نشده بود ژن‌های اختصاصی بیوسنتز آفلاتوکسین هم دیده نشدند. کنترل مثبت برای نتایج آزمون‌های مولکولی PCR و اندازه‌گیری آفلاتوکسین با سویه قارچ آسپرژیلوس فلاووس خالص با شماره شناسایی PTTC No: 5018 تهیه‌شده ازمرکز کلکسیون قارچ و باکتری ایران انجام شد.(۴)



شکل ۲- ژل الکتروفورز محصول ژن *ver1* با اندازه ۶۰۰-۵۰۰ باز

٤-نتیجه‌گیری

از آن‌جائی که بر اساس آخرین گزارش سازمان غله ایران در سال ۱۴۰۰، مصرف سالانه برنج نزدیک ۴۰ کیلوگرم برای هر نفر می‌باشد، کنترل کیفیت در این محصول بسیار مهم است. بر این‌اساس، با توجه به دقت بالای شناسایی دو ژن aflR ,ver 1 به عنوان روشی سریع و کم‌هزینه در مقایسه با روش‌های کشت وشناسایی مورفولوژیک قارچ، می‌تواند جهت جداسازی گونه‌های مولد آفلاتوکسین، به‌خوبی موثر باشد. دوگونه مولد آفلاتوکسین

جداسازی شده کاملا با گونه‌های شایع در سایر غلات‌مطابقت دارند و نشان می‌دهد این گونه‌ها گسترش بسیار زیادی دارند وکنترل‌آلودگی‌ازمراحل‌ابتدایی‌بسیارمهمتراز فرایندهای‌کنترلی در انتهای عرضه برنج می‌باشد تا ضمن حفظ سلامت محصول، از مصرف مواد نگهدارنده جلوگیری شود. انجام مطالعات بر روی مراحل مختلف از ابتدای تولید تا عرضه‌ی فراورده‌های غذایی‌پرمصرف مانند برنج برای ارائه محصولات سالم وطبیعی پیشنهاد می گردد.

۵-سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی موسسه علوم تحقیقاتی امین آزمای شرق و دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز انجام شده است.

٦-منابع

1. Davari E, Mohsenzadeh M, Mohammadi, G. and Rezaeian-Doloei, R. Characterization of aflatoxigenicAspergillusflavus and A. parasiticus strain isolates from animal feedstuffs in northeastern Iran. *Iranian journal of veterinary research*. 2015; 16(2): 150-158
2. Erami M, Hashemi S. J, Pourbakhsh S. A, Shahsavandi S, Mohammadi S, Shooshtari A. H, Jahanshiri Z. Application of PCR on detection of aflatoxinogenic fungi. *Archives of Razi Institute*. 2007; *62*(2): 95-100.
3. Gallo A, SteA G, BAttiLAni P, LoGRieCo A. F, PeRRone G. Molecular characterization of an Aspergillus flavus population isolated from maize during the first outbreak of aflatoxin contamination in Italy. *Phytopathologia Mediterranea*. 2012;16(4): 198-206.
4. Hedayati M. T, Omran S. M, Soleymani A, Armaki M. T. Aflatoxins in food products in Iran: A review of the literature. *Jundishapur journal of microbiology*. 2016; *9*(7): 123-129
5. Konietzny U, Greiner R. The application of PCR in the detection of mycotoxigenic fungi in foods. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2003; 34(4): 283-300.
6. Lai X, Liu R, Ruan C, Zhang H, Liu C. Occurrence of aflatoxins and ochratoxinA in rice samples from six provinces in China. *Food Control*. 2015; *50*: 401-404.
7. Lee C. Z, Liou G. Y, Yuan G. F. Comparison of the aflR gene sequences of strains in Aspergillus section Flavi. *Microbiology. 2006; 152*(1): 161-170.
8. Magnani M, Fernandes T, Prete C. E. C, Homechim M, Ono E. Y. S, Vilas-Boas L. A, et al. Molecular identification of Aspergillus spp. isolated from coffee beans. *Scientia Agricola*. 2005; *62*(1): 45-49.
9. Mostafa A A, Amer S. M. Molecular characterization of toxigenic Aspergillus flavus strains isolates from animal feed stuff in Egypt. *Life Science Journal*. 2013; *10*(2): 20-30.
10. Moubasher H, Abutaleb A, Senousy H. H. Molecular differentiation between aflatoxinogenic and nonaflatoxinogenic strains of Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus. *Microbiology*. 2013; 82(1): 642-646
11. Reddy K. R. N, Reddy C. S, Muralidharan K. Efficacy of certain agrochemicals on Aspergillus spp. And subsequent aflatoxin production in rice. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2008; 174(3): 1541-1550
12. Rosa C. A. R, Cavaglieri L. R, Ruadrew S . Craft J, Aidoo K. Occurrence of toxigenic Aspergillus spp. and aflatoxins in selected food commodities of Asian origin sourced in the West of Scotland. *Food and Chemical Toxicology*. 2013; 55(1): 653-658
13. Thathana M. G, Murage H, Abia A. L. K, Pillay M. Morphological Characterization and Determination of Aflatoxin-Production Potentials of Aspergillus flavus Isolated from Maize and Soil in Kenya. *Agriculture*. 2017; *7*(10): 75-80.
14. Zhang K, Banerjee k. A Review: Sample Preparation and Chromatographic Technologies for Detection of Aflatoxins in Foods. *Toxins*. 253; 12(1): 1-39.

(Original Research Paper)

Isolation of Aflatoxin-producing Species Based on Detection of afl R and ver 1 Genes and Sspecies Identification by Determination of ITS Sequences in Edible Rice of Mashhad, Khorasan

Hamed Faraji[1*], Farideh Tabatabaee Yazdi[2], Nematollah Razmi[3]

1-Ph.D Student of Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Agriculture and Modern Technology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran.
2-Professore, Department of Food Science and technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
3-Professore, Department of Microbiology, College of Sciences, Agriculture and Modern Technology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran.

Received:01/06/2022 Accepted:17/10/2022

DOI: 10.30495/jfst.2022.1959801.1801

Abstract

Rice is an important cereal and also one of the essential sources of energy in the world and especially in the eastern world. Because of nutritional value and relative humidity, rice is certainly exposed able to contamination with molds. Aflatoxin is a type of secondary metabolites and one of the most dangerous and important fungal toxins. Aflatoxigenic Aspergillus species can be very terrible in cereal and dried fruits. Aspergillus flavous and A.parasiticus are two famous and most known species responsible for the contamination of food and feed stuff. Culturing and morphological characteristics were used in identification and isolation of Aspergillus isolates. Then molecular evaluation of the gene involves in the aflatoxin biosynthesis process was done by PCR. ver 1, aflR are structural and regulatory gene that has a critical role in aflatoxin producing system. Toxin production of isolated species gets confirmed by HPLC and Immunoaffinity column method. Results showed 20 samples of 60 have aflatoxigenic fungi. 2 types of fungi with similar morphological characteristics of Aspergillus flavous and A. parasiticus were identified and cultured on AFPA (specific culture media) for verification. PCR molecular test and cultural morphology were accepted by together in 90 percent of samples. In 3 cases aflR, ver 1 was not detected that HPLC method was approved too. Results shows PCR of critical gene of aflatoxin biosynthesis like aflR, ver 1 can be recommend as a good method for confirm of toxigenic aspergillus species. ITS sequencing showed that Aspergillus flavus Accession No MG430332.1 and Aspergillus parasiticus Accession No MH937579.1 are predominant in rice. It is recommended to study the species that produce ochratoxin (another important mycotoxin) in rice and other cereals.

Keywords: Aflatoxin, Aspergillus, PCR.

*Corresponding Author: hamed.0102@gmail.com