جداسازی و شناسایی قارچ آسپرژیلوس فلاووس توکسین‌زا جداشده از پسته‌های شهر رفسنجان با بررسی بیان ژن nor-1 دخیل در مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین

مژگان سقازاده[1*]، بیتا نجمی[2]

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

۲. دانشجوی کارشناسی‌ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۳/۰۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۶/۰۳)

چکیده

هدف: آفلاتوکسین‌ها از متابولیت‌های ثانویه قارچ‌ها هستند که فوق العاده سمی و سرطانزا می باشند و می توانند باعث آلودگی مواد غذایی مختلفی همچون خشکبار مانند پسته شوند. از آنجایی که ایران یکی از بزرگترین صادرکنندگان پسته درجهان است و یکی از آلودگی‌های مهم پسته آفلاتوکسین است، هدف از این تحقیق جداسازی و شناسایی قارچ آسپرژیلوس فلاووس توکسین‌زای جدا شده از پسته‌های شهر رفسنجان با بررسی بیان ژن *nor-1* دخیل در مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین به روش مولکولی RT-PCR می‌باشد.

مواد و روش: در این تحقیق به طور تصادفی از ۱۰ خشکبار فروشی در نقاط مختلف شهررفسنجان،نمونه‌های پسته گردآوری و یک مجموعه از ۱۰۰۰ عدد پسته تهیه شد، سپس با تکنیک‌های میکروبی قارچ‌های آنها جداسازیشدند و با بررسی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی حضور قارچ‌های آسپرژیلوس فلاووس تایید شد. سپس محتویات ژنومی و RNA قارچ‌ها استخراج ، تخلیص و آزمایش RT-PCR جهت بررسی بیان ژن مورد نظر انجام شد.

نتایج و نتیجه‌گیری: در این تحقیق ۴۲ سویه قارچ آسپرژیلوس فلاووس جدا شده از پسته‌های محصول شهر رفسنجان مورد بررسی قرار گرفت. درنهایت ۹ نمونه از ۴۲(۲۱/۴٪) نمونه‌ی بررسی شده برای ژن*nor-1* دارای بیان و به عبارت دیگر توکسین‌زا بودند. آلودگی به آفلاتوکسین‌در نقاط مختلف دنیا در انواع مواد غذایی و در مقادیر مختلف گزارش شده است که برای سلامت عمومی می‌تواند یک تهدید باشد، پس بکارگیری نظارت و روش‌های صحیح نگهداری، توزیع و تشخیص سریع به کمک روش‌های مولکولی، جهت کاهش میزان آلودگی مواد غذایی بخصوص محصولات خشکبار به قارچ‌های مولد آفلاتوکسین ضروری می‌باشد.

کلیدواژگان

آسپرژیلوس فلاووس، آفلاتوکسین، پسته، ژن nor-1.

* نویسنده مسئول، رایانامه: saghazadeh_99@yahoo.com

مقدمه

آسپرژیلوس‌ها یکی از شایع ترین قارچ‌های محیطی هستند که در حدود ۹۰۰ گونه برا ی آنها شناسایی شده است .تعدادی ازگونه‌ها متابولیت‌های ثانویه مفیدی مانند آنتی بیوتیک‌ها و داروها را تولید می‌کنند و برخی نیز قادرند تولید سم کنند (Brakhage,2008 ; Yu, 2012). مایکوتوکسین‌ها دارای ساختارهای شیمیایی، تأثیرات و فعالیت‌های زیستی بسیار گوناگونی هستند (Sweeney & Dobson, 1998). در جنس آسپرژیلوس، آسپرژیلوس فلاووس از نظر اقتصادی و غذایی بسیار مهم است زیرا تولید کننده آفلاتوکسین میباشد. آسپرژیلوس فلاووس در منابع غذایی مانند محصولات کشاورزی، بقایای گیاهی، علوفه‌ی حیوانی،کودها، لاشه‌ی حشرات و حیوانات، دانه‌های ذخیره شده و حتی انسان‌ها و حیوانات دارای نقص ایمنی قادر به رشد و بقا هستند (Klich, 1998). آنها قابلیت رشد در دماهای ۱۲ تا ۴۸ درجه‌ی سانتی‌گراد را داشته که البته دمای بهینه رشد آنها بین ۲۸ تا ۳۸ درجه‌ی سانتی‌گراد است. توانایی نسبی رشد در دمای بالای آن‌ها منجربه بیماریزایی در انسان و دیگر حیوانات خون‌گرم می‌شود. (Yu, 2012). قارچ‌های آسپرژیلوس فلاووس فرصت طلب هستند که بر روی محصولات کشاورزی مانند ذرت، کتان، بادام زمینی و همچنین درختانی مانند درخت بادام و پسته، رشد می‌کنند. آلودگی محصولات به آفلاتوکسین قبل از برداشت رایج است. همچنین فساد محصولات برداشت شدهدر حین انبار کردن نیزتوسط آسپرژیلوس فلاووس می‌تواند ایجاد شود. از آنجایی که قارچ آسپرژیلوس فلاووس فاقد میزبان اختصاصی است، توانایی ایجاد آلودگیِ دانه‌های گیاهان تک‌لپه و دولپه، و همچنین دانه‌های بالاتر از سطح زمین (ذرت و پسته) و زیر زمین (بادام زمینی) را دارا است (St Leger, Screen, & Shams-Pirzadeh, 2000). در شرایط آب و هوایی مناسب برای رشد ، آسپرژیلوس فلاووس می‌تواند باعث فساد دانه‌های غذایی شده که نتیجه‌ی آن زیان اقتصادی قابل توجه به کشاورزان می‌باشد (Council for Agricultural Science and Technology., 2003).

قارچ آسپرژیلوس فلاووس بیشتر آفلاتوکسین نوع B1و B2را تولید می‌کنند، درعین حال آسپرژیلوس پارازیتیکوس نیز آفلاتوکسین‌های نوع B1،B2،G1و G2 را تولید می‌کنند. نام گذاری این ۴ گروه اصلی آفلاتوکسین برمبنای رنگ آبی(Blue) و سبز(Green) آنها زیر نور فرابنفش و حرکتی نسبی آنها با کروماتوگرافی لایه نازک بر روی ژل سیلیکا، صورت گرفته است. آفلاتوکسینM1 مشتقی از آفلاتوکسینB1 است که در بدن گاو متابولیزه شده و در شیر ترشح می‌شود (H. P. Van Egmond, 1989). در بین این ۴ گروه اصلی آفلاتوکسین، B1 سمی‌ترین و دارای بیشترین پتانسیل سرطانزایی در انسان و حیوانات مانند ماهی‌ها، پرندگان و جوندگان می‌باشد. آلودگی و مصرف مداوم این سم می‌تواند منجربه سرکوب سیستم ایمنی، سوءتغذیه، ضایعات کبدی، نکروز کبدی، ایجاد کبد چرب و سرطان کبد شود. در حیوانات آزمایشگاهی آفلاتوکسینB1 به یک محصول فرعی باقدرت سرطانزایی و سمیت بیشتر در طی سم زدایی توسط سیتوکروم P450 مونواکسیژناز در کبد تبدیل می‌شود (Eaton & Gallagher, 1994; Lewis et al., 2005). فرم اپوکسید آفلاتوکسین با باز گوانین ملکولDNA باند تشکیل می دهد و N7 guanynl- ایجاد میکند که موجب جهش می‌شود. از طرف دیگر آفلاتوکسینB1 یک عامل سرکوب کننده‌ی ایمنی نیز هست (Raisuddin, Singh, Zaidi, Paul, & Ray, 1993) و دوز پایین آفلاتوکسین در مهره‌داران در حال رشد، استعداد آن‌ها را در ابتلا به عفونت و تومورزایی افزایش می‌دهد(Raisuddin et al., 1993).

پسته یکی از مهمترین محصولات کشاورزی است که اهمیت زیادی در صادرات و اقتصاد کشور دارد. پسته با تولیدی معادل ۲۰۰ هزار تن با ارزش بالای صادراتی، پس از نفت مهمترین منبع درآمد ارزی کشور است. گونه‌های مختلف آسپرژیلوس به صورت خاک برد و هوا برد در بیشتر مناطق پسته کاری کشور سازگار شده اند و قادر به آلوده سازی مغز میوه‌ها و پسته‌های ترک خورده اند (فانی و همکاران، ۱۳۹۲).

یکی از مسایل جدی که امروزه صادرات این محصول را در معرض خطر قرار داده است وجود سم آفلاتوکسین در پسته‌های تولیدی می باشد ، در صورتی که پوست رویی پسته به هر دلیلی خسارت ببیند قارچها قادر خواهند بود در معرض بافت‌های داخلی قرار بگیرند ، در این صورت سطح رطوبتی این محیط معمولا به اندازه کافی بالا بوده و شرایط را برای رشد قارچ آسپرژیلوس فراهم می کند.

با توجه به اینکه تاکنون تحقیقی در خصوص جداسازی و شناسایی قارچ آسپرژیلوس فلاووس‌توکسین‌زا از پسته‌های کشورمان با روش مولکولی صورت نگرفته است لذا مطالعه حاضر با هدف جداسازی و شناسایی قارچ آسپرژیلوس فلاووس سم زا از غیر سم زا با روشی با دقت و اطمینان بالا صورت گرفته است .

در بیوسنتز آفلاتوکسین،۳۰ ژن نقش دارند. این ژن‌ها در آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس بصورت یک خوشه‌ی ژنومی ۷۵kb هستند که در کروموزوم شماره‌یIII قارچ در فاصله‌ی ۸۰kb تلومر جای گرفته اند (Yu, Bhatnagar, & Cleveland, 2004; Yu, Chang, et al., 2004). در این بین برخی از ژن‌های این خوشه بیان پروتئین‌ها و آنزیم‌های دخیل در بیوسنتز آفلاتوکسین را تنظیم می‌کنند. اولین مرحله‌ی تولید آفلاتوکسین بیان یک آنزیم ردوکتازی برای تبدیل NOR (Norsolorinic acid) به آفلاتوکسین نهایی می‌باشد. نورسولورونیک اسید اولین پیش‌ساز ثابت در بیوسنتر آفلاتوکسین می‌باشد و کشف آن سبب شناسایی دیگر مواد حد واسط و متابولیت‌های بعدی مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین و جداسازی اولین ژن بیوسنتز آفلاتوکسین که کد کننده‌ی یک ردوکتاز جهت تبدیل NORبه آفلاتوکسین است، گردید (Yu J,Chang PK,1995). یکی از آنزیم‌های کلیدی بیوسنتز آفلاتوکسین nor-1 (که نام دیگر آن aflD است) می‌باشد که عدم بیان آن روند تولید سم را متوقف می‌کند. با کمک نوترکیبی ژن nor-1 در باکتری اشریشیاکلای مشخص شد که محصول این ژن یک آنزیم ردوکتازی است که نورسولورونیک اسید را احیا می‌کند. از این‌رو این ژن کتوردوکتازی را کد می‌کند که گروهKeto-1´در نورسولورونیک اسید را به hydroxil-1´در AVN تبدیل می‌کند. در مراحل اولیه بیوسنتز آفلاتوکسین، نورسولورونیک اسید (NOR) که خود توسط پیش‌سازهای استاتی و پلی‌کتایدی تولید می‌شود، توسط آنزیم ردوکتازیِ محصول ژن nor-1 به آورانین (AVN) تبدیل می‌شود. آورانین نیز توسط یک آنزیم مونواکسیژناز کد شده توسط ژن avn-1 به ۵-هیدروکسی آورانین(HAVN) تبدیل می‌شود. HAVNخود پیش ساز تولید آفلاتوکسین می‌باشد (Yu J, Chang PK,Ehrlich, 2004 ; Yabe K, Matsusyama Y, 1993). با توجه به توضیحات ذکر شده و نقش مهم آنزیم ردوکتازی ژن nor-1 در پیشبرد مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین می‌توان از مطالعه و بررسی بیان این ژن جهت تشخیص توانایی تولید سم در قارچ بهره برد. هدف از این تحقیق نیز مطالعه‌ی پراکندگی قارچهای آسپرژیلوس فلاووس توکسین‌زا (واجدژن1-nor) در تعدادی از پسته‌های شهر رفسنجان به روش RT-PCR می‌باشد.

مواد و روش

در طول انجام این پژوهش به طور تصادفی به ۱۰خشکبارفروشی در نقاط مختلف شهرمراجعه کرده و نسبت به جمع آوری نمونه‌های پسته اقدام شد (از هرمغازه صد عدد) و یک مجموعه از۱۰۰۰ نمونه پسته از ۱۰ آجیل فروشی مختلف شهر به طور تصادفی جمع آوری شد. نمونه‌ها مستقیماً از آجیل فروشی‌ها خریداری شدند و بعد از خریداری در بسته‌های استریل دور از رطوبت نگهداری شدند. سپس تمام بسته‌ها شماره گذاری و در آزمایشگاه تا زمان بررسی در یخچال در دمای^{o}C۶-۴ نگهداری شدند. ابتدا ۱۰۰عدد (حدود۱۰۰ گرم) از هرنمونه را با سدیم هیپوکلریت ۰/۴ درصد شستشو داده (بمدت یک دقیقه) تا هرنوع آلودگی ازسطح آن پاک شود، سپس با آب مقطر استریل شستشو داده و اجازه دادیم تا خشک شود. سپس پسته‌های خشک شده بوسیله ورتکس پودر شدند. جهت کشت قارچ‌های موجود، محیط سابورو دکستروز آگار حاوی آنتی بیوتیک کلرامفنیکل جهت جلوگیری از رشد باکتریها، و محیط چاپکس آگار که محیط اختصاصی جهت رشد آسپرژیلوس‌ها است، بکار گرفته شدند که مطابق پروتکل شرکت سازنده اقدام به تهیه آنها شد. لازم به ذکر است محیط‌های کشت محصول شرکت Ibresco می‌باشد. سپس یک گرم از پودر پسته را داخل ۵۰ml آب مقطر استریل حل کرده و ۱ml از آن را توسط سمپلر برداشت کرده و درپلیت‌های حاوی سابورو دکستروز آگار حاوی آنتی بیوتیک کلرامفنیکل و محیط چاپکس آگار کشت داده و بوسیله سواپ استریل روی محیط پخش شد و بمدت یک هفته در دمای اتاق ۲۵-۲۸درجه سانتیگراد نگهداری و ازنظر رشد قارچی کنترل شدند. سپس با بررسی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی وجود قارچ آسپرژیلوس فلاووس، تایید و جداسازی شد. از پلیت‌هایی که حاوی آسپرژیلوس فلاووس بودند به روش نشاکاری کلنی تک گرفته شد و جهت آزمون RT-PCR جداسازی شدند.استخراج RNAتوسط کیت Total RNA Purification Kit شرکت Jena Bioscience GmbHمطابق پروتکل صورت گرفت.بعد از آن سنتز cDNA از RNAهای استخراج شده به کمک کیت Revert AID First Strand cDNA synthesis شرکت Fermentsو مطابق پروتکل کیت انجام شد. چون مولکول RNAنیمه‌عمر کوتاهی دارد و سریع تجزیه می‌شود به منظور رفع این مشکل برای بررسی‌های بعدی به سنتز cDNA می‌پردازیم که رشته مکمل RNAاست با این تفاوت که پایدارتر می‌باشد و کار با آن راحت‌تر می‌باشد.مکانیسم عمل به این صورت است کهOligo dTبه دم پلیAانتهای mRNAهای استخراج شده متصل می‌شود و مانند پرایمر برای آنزیم RTعمل می‌کند. این آنزیم که نوعی پلیمراز است از انتهای'3پرایمر با استفاده از dNTPهای درون محیط و با کمک بافر، رشته ی مکمل mRNA از جنسDNA را سنتز می‌نماید. این مرحله نیز در زیر هود بیولوژیکی انجام می‌گیرد. چک نمودن مراحل سنتز cDNA به دو طریق صورت گرفت، الکتروفورز نمونه‌های cDNAدر آگارز ۱٪ و انجام واکنش PCR. در این روش با پرایمرهای یک ژن کنترل داخلی (House-keeping gene) و cDNA سنتزشده PCR انجام می‌دهیم و صحت کار خود را با مشاهده جواب و مقایسه با کنترل مثبت تایید می‌نماییم. توالی پرایمر اختصاصی برای ژن *nor-1*(طول قطعه مورد نظر با اندازه 161 bp) عبارتست از: Forward: 5'- ACG GAT CAC TTA GCC AGC GC -3' و Reverse: 5'- CTA CCA GGG GAG TTG AGA TCG -3'. توالی پرایمر بتااکتین، به عنوان استاندارد داخلی و ژن خانه دار، با قطعه ای با طول 180bp بشرح زیر است: Forward: 5'- AGA CGC AGG ATG GCA TGG G-3' و Reverse: 5'- GAG ACC TTC AAC ACC CCA GCC-3'.

آزمایش RT-PCR

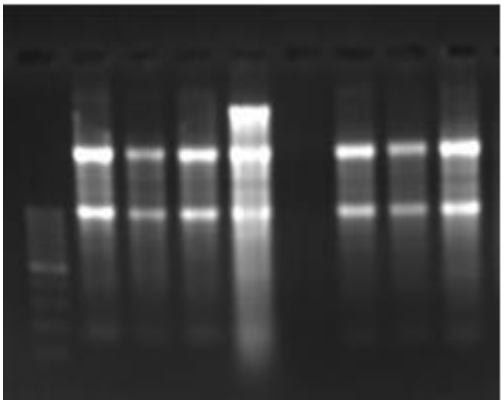
بدین منظور مواد لازم با مقادیر مشخص شده در زیر برای هر نمونه با حجم نهایی ۱۲µL، مورد استفاده قرار گرفت. مقادیر به این شرح است: Mastermix, amplicon 6µL، Primers 0.5µL، cDNA Water 4µL،1µL. در نهایت میکروتیوب‌ها در دستگاه ترموسایکلر با شرایط دمایی جدول ۱ گذاشته شد.

جدول ۱- شرایط دمایی برای پرایمر بتااکتین و*nor-1*

شرایط دمایی	دما	زمان	تعداد سیکل
دناتوراسیون	۹۴C°	۵ دقیقه	۱
دناتوراسیون	۹۴C°	۴۵ ثانیه	۳۵
Annealing	۵۸C°	۴۰ ثانیه	
طویل سازی	۷۲C°	۴۵ ثانیه	

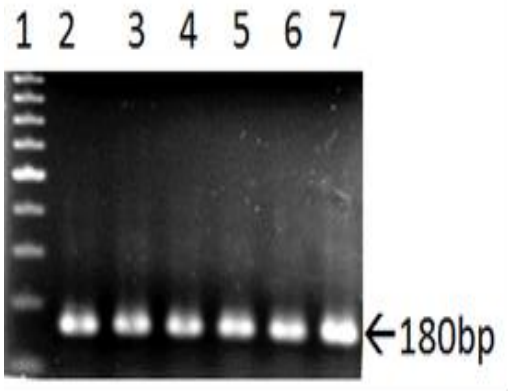
نتایج

برای ارزیابی کیفیت و کمیتRNA استخراج شده، به ترتیب از الکتروفورز با ژل آگارز (شکل۱) واسپکتروفتومتر(Nano Drop) استفاده شد. نتایج حاکی ازخلوص و یکپارچگی RNAاستخراج شده از بافت بود.یادآوری می گردد که کنترل مثبت در این آزمایش، نمونه قارچ آسپرژیلوس فلاووس توکسین زا خریداری شده از سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران می باشد.



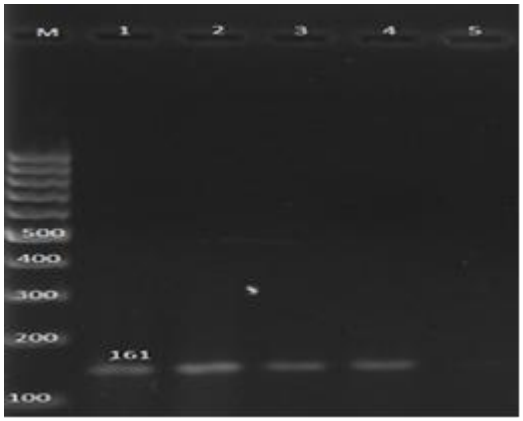
شکل ۱- سمت چپ- الگوی RNA استخراج شده از نمونه‌های قارچی برروی آگارز ۱/۵٪

ارزیابی صحت سنتز cDNA با آزمایش RT-PCR و به کمک پرایمر اختصاصی ژن β اکتین (به عنوان یک ژن housekeeping) انجام شد. (تصویر ۲). نتایج این آزمایش نشان داد که در تمامی نمونه‌های قارچی، ژن بتااکتین بیان دارد و روشن است.



شکل ۲- الگوی حاصل از قطعات cDNA تکثیر شده توسط پرایمرژن β اکتین بر روی آگارز۱/۵٪

در تصویر فوق از چپ به راست به ترتیب: لاین ۱: سایز مارکر 100bp از شرکت fermentase کانادا، لاین ۲: کنترل مثبت، لاین‌های ۳ تا ۷: چند تا از نمونه‌ها که بصورت الگو آورده شده است. اندازه قطعه تکثیر شده برای این ژن، 180bp می باشد و تمامی نمونه‌ها برای این ژن خانه دار دارای بیان بود.



شکل ۳- الگوی حاصل از قطعات cDNA تکثیر شده توسط پرایمر ژن*nor-1* با آزمایش RT-PCR بر روی آگارز۱/۵٪

در تصویر بالا به ترتیب از چپ به راست: لاین (M): سایز مارکر bp۱۰۰ از شرکت fermentase کانادا، لاین ۱: کنترل مثبت، لاین ۵ کنترل منفی، لاین‌های ۲ تا ۴ چند تا از نمونه‌ها که برای ژن مورد نظر دارای بیان بود. اندازه قطعه تکثیر شده برای این ژن ، ۱۶۱bp می باشد.

هدف از این مطالعه، جداسازی و شناسایی قارچ آسپرژیلوس فلاووس توکسین زا جدا شده از پسته‌های شهر رفسنجان با بررسی بیان ژن *nor-1* به روش مولکولی RT-PCRبود. در این تحقیق ۴۲ سویه قارچ آسپرژیلوس فلاووس جدا شده از پسته‌های محصول شهر رفسنجان مورد بررسی قرار گرفت. درنهایت ۹ نمونه از ۴۲(۲۱/۴٪) نمونه‌ی بررسی شده دارای بیان در ژن *nor-1* و بعبارتی توکسین‌زا بودند. بعنوان کنترل مثبت نیز، نمونه قارچ آسپرژیلوس فلاووس توکسین زا خریداری شده از سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران با کد ۵۰۰۴ می باشد.

بحث

مایکوتوکسین‌ها متابولیت‌های ثانویه قارچی هستند که به دنبال رشد قارچ‌های توکسین‌زا در مواد غذایی،تولید و کیفیت آنها را تحت تأثیر قرار می‌دهند، بنابراین برای تامین سلامت مصرف کنندگان لازم است که وجود و مقدار مایکوتوکسین‌های مختلف در مواد غذایی به طور دائم اندازه‌گیری شده و برای به حداقل رساندن آنها در زنجیره غذایی برنامه ریزی شود. دانه‌ها و آجیل‌ها از جمله محصولاتی هستند که قبل از برداشت و در حین ذخیره سازی آنها می‌توانند دچار آلودگی قارچی از جمله قارچ آسپرژیلوس فلاووس شوند. برخی سویه‌های این قارچ‌ها توانایی تولید سم آفلاتوکسین را دارا هستند. پسته یکی ازمحصولات خشکبار بومی کشور ایران ، با اهمیت اقتصادی و صادراتی بالا و بومی ایران می‌باشد که به خاطر کیفیت عالی آن در بین کشورهای تولید کننده این محصول از مرغوبیت ویژه ای برخوردار است. برطبق آمار سازمان خواربار و کشاورزی ملل‌متحد فائو، ایران بزرگترین تولید کننده پسته در دنیا می‌باشد. به همین دلیل پسته ایران در بین محصولات صادراتی و ارز آور کشور اهمیت خاصی داشته که باید برای حفظ و ارتقای موقعیت جهانی آن تلاش بیشتری انجام گردد. مسئله آلودگی پسته به آفلاتوکسین در بررسی‌های متعددی در ایران و جهان مورد توجه قرار گرفته است. آفلاتوکسین‌ها دارای سمیت و قدرت جهش‌زایی بالا می‌باشند و می‌تواند باعث آسیب جدی و ایجاد سرطان در اندام‌هایی نظیر کبد و ریه‌ها شود، از این رو بکارگیری روش‌ها تشخیص سریع و معتبر مانند روش‌های مولکولی برای وجود سم و یا سویه‌های تولیدکننده‌ی آنها ضروری می‌باشد. هدف از انجام این پژوهش جداسازی و شناسایی قارچ آسپرژیلوس فلاووس توکسین زا جدا شده از پسته‌های شهر رفسنجان با بررسی بیان ژنnor-1 به روش مولکولی RT-PCR بود. محصول ژنnor-1 یک آنزیم ردوکتازی است که نورسولورونیک را که یک پیش‌ساز ضروری برای تولید آفلاتوکسین است را به آورانین در مراحل اولیه تولید آفلاتوکسین کاتالیز می‌کند و در صورت عدم بیان این ژن پروسه‌ی تولید و بیوسنتز سم متوقف می‌شود، پس می‌توان از آن بعنوان یک مارکر مولکولی و تشخیص قارچ‌های توکسین‌زا بهره برد.در این تحقیق یک مجموعه از ۱۰۰۰ نمونه پسته از ۱۰ آجیل فروشی مختلف شهر به طور تصادفی جمع آوری شد. نهایتا ۴۲ سویه قارچ آسپرژیلوس فلاووس جدا شده از پسته‌های شهر رفسنجان مورد بررسی قرار گرفت. سویهِ کنترل مثبت این پژوهش نیز نمونه قارچ آسپرژیلوس فلاووس توکسین زا خریداری شده از سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران با کد ۵۰۰۴ می باشد. درنهایت ۹

نمونه از ۴۲(۲۱/۴٪) نمونه‌ی بررسی شده دارای بیان در ژن1-nor و بعبارتی توکسین‌زا بودند. در راستای همین بررسی می‌توان مطالعه‌یکرایسئو و همکارانش در سال ۲۰۰۱، پژوهشی جهت جداسازی قارچ‌های آسپرژیلوس فلاووس مولد آفلاتوکسین برپایه‌ی روش PCRبرای ژن‌ها omt-A,ver-1,nor-1,aflR انجام دادند که نتایج آن نشان داد که باندهای چهار ژن یاد شده تنها در سویه‌های مولد آفلاتوکسین بصورت همزمان مشاهده می‌شود در حالیکه در سویه‌های غیر توکسین‌زا این باند دیده نمی‌شود و یا تعداد کمتری مشاهده می‌شود (Criseo, Bagnara, & Bisignano, 2001). چراغعلی و همکاران (۲۰۰۷) نیز در پژوهشی به بررسی میزان آلودگی پسته‌های ایرانی به سم آفلاتوکسین B1پرداختند با این تفاوت که مطالعه‌ی آنان برپایه‌ی روش‌های HPLC و TLC بود که مشخص گردید در ۳۳۵۶ نمونه این تحقیق، ۱۱/۸٪ نمونه‌ها بیشتر از حد مجاز آفلاتوکسینB1 در ایران، یعنی ۵ µg در کیلوگرم، بودند (Cheraghali et al., 2007). ارمی و همکاران (۲۰۰۷) از ۴ جفت پرایمر *nor1/nor2*، *ver1/ver2*، *omt1/omt2*، *aflR1/aflR2* به منظور تشخیص قارچهای مولد آفلاتوکسین پرداختند. از میان ۱۴ سویه آسپرژیلوس فلاووس مورد بررسی، در سه نمونه باندهای مربوط به تکثیر نواحی مختلف مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین مشاهده شد (Erami, 2007). در مجموع نتایج این مطالعه و سایر مطالعات انجام شده بر روی پسته و دیگر غلات و مواد خوراکی ، در بسیاری از کشورها، نشان می دهند که آلودگی به آفلاتوکسینبه مقادیر مختلف وجود دارد، که می‌تواند بعنوان یک عامل تهدیدکننده برای سلامت عموم جامعه مطرح باشد. میزان کم آفلاتوکسین حتی زمانیکه میزان دوز آن کشنده نیست، به طور جدی می تواند منجر به آسیب رسانی به سلامت فردی شود.باتوجه به میزان آلودگی بالای ۲۰ درصدی (۲۱/۴درصد) پسته‌های جمع آوری شده از فروشگاه و مراکز توزیع آجیل و خشکبار، به سویه‌های آسپرژیلوس فلاووس توکسین زا طبق نتایج بدست آمده ی در این پژوهش و پیش بینی مقادیر بالاتر آلودگی در حجم محصولات در مقیاس بالا می تواند علاوه بر سلامت فردی، تجارت پسته را نیز تحت شعاع خود قرار دهد و همین توجیهی برای بکار گیری روش‌های سریع تشخیص آلودگی مانند روش‌های مولکولی برای تشخیص آلودگی محصولات خشکبار و خوراکی می باشد. در نهایت می توان گفت بهترین اقدام برای جلوگیری از پیامدهای آفلاتوکسین و کاهش میزان آفلاتوکسین در پسته و خشکبار، نظارت و کنترل مستمر مقامات مسئول بر تولید، نگهداری و توزیع آنها و بررسی و تشخیص کلیه عوامل موثر بر ایجاد سم، تشخیص نمونه‌های آلوده و مقابله صحیح با قارچهای توکسین‌زا است. هم چنین ایجاد شرایط ایده‌آل برای به حداقل رساندن آلودگی امری لازم برای سلامت مصرف کنندگان می‌باشد.

منابع و مآخذ

1. Brakhage, A. A., Schuemann, J., Bergmann, S., Scherlach, K., Schroeckh, V., & Hertweck, C. (2008). Activation of fungal silent gene clusters: a new avenue to drug discovery. *Prog Drug Res, 66*, 1, 3-12 .
2. Cary, J. W., Ehrlich, K. C., Wright, M., Chang, P. K., & Bhatnagar, D. (2000). Generation of aflR disruption mutants of Aspergillus parasiticus. *Appl Microbiol Biotechnol, 53*(6), 680-684 .
3. Chang, P. K., Ehrlich, K. C., Yu, J., Bhatnagar, D., & Cleveland, T. E. (1995). Increased expression of Aspergillus parasiticus aflR, encoding a sequence-specific DNA-binding protein, relieves nitrate inhibition of aflatoxin biosynthesis. *Appl Environ Microbiol, 61*(6), 2372-2377 .
4. Cheraghali, A. M., Yazdanpanah, H., Doraki, N., Abouhossain, G., Hassibi, M., Ali-abadi, S., . . . Zamanian, F. (2007). Incidence of aflatoxins in Iran pistachio nuts. *Food& Chemal Toxicology, 45*(2007), 812-816.
5. Council for Agricultural Science and Technology. (2003). *Mycotoxins : Risks in Plant, animal, and Human systems*. Ames, Iowa, USA.
6. Criseo, G., Bagnara, A. & .Bisignano, G. (2008). Differentiation of aflatoxin-producing and non-producing strains of Aspergillus flavus group. *Letters Applied Microbiology. 33*(4), 291-295.
7. Eaton, D. L., & Gallagher, E. P. (1994). Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. *Annu Rev PharmacolToxicol, 34*, 135-172. 10.1146/annurev.pa.34.040194.001031.
8. Erami, M., S.J., Hashemi, S.A., Pourbakhsh, S., Shahsavandi, S., Mohammadi, A.H., Shooshtari, Z., Jahanshiri. (2007). Application of PCR on detection of aflatoxinogenic fungi. *Archive of RaziInstitute*(62(2)), 95-100.
9. Klich, M. A. (1998). Soil fungi of some low-altitude desert cotton fields and ability of their extracts to inhibit Aspergillus flavus. *Mycopathologia, 142*(2), 97-100.
10. Lewis, L., Onsongo, M., Njapau, H., Schurz-Rogers, H., Luber, G., Kieszak, S., . . . Kenya Aflatoxicosis Investigation, G. (2005). Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in eastern and central Kenya. *Environ Health Perspect, 113*(12), 1763-1767.
11. Raisuddin, S., Singh, K. P., Zaidi, S. I., Paul, B .N., & Ray, P. K. (1993). Immunosuppressive effects of aflatoxin in growing rats. *Mycopathologia, 124*(3), 189-194.
12. St Leger, R. J., Screen, S. E., & Shams-Pirzadeh, B. (2000). Lack of host specialization in Aspergillus flavus. *Appl Environ Microbiol*, 66(1), 320-324.
13. Sweeney, M. J., & Dobson, A. D. (1998). Mycotoxin production by Aspergillus, Fusarium and Penicillium species. *Int J Food Microbiol, 43*(3), 141-158.
14. Van Egmond, H. P. (1989). Current situation on regulations for mycotoxins. Overview of tolerances and status of standard methods of sampling and analysis. *Food Addit Contam, 6*(2), 139-188.
15. Van Egmond, H. P. J., M.A. (2005). Worldwide Regulations on Aflatoxins. *CRC Press: Boca Raton, FL, USA*, 77–93.
16. Yabe K, Matsuyama Y, Ando Y, Nakajima H, Hamasaki T. Stereochemistry during aflatoxin biosynthesis: conversion of norsolorinic acid to averufin. Applied and environmental microbiology. 1993;59(8):2486-92.
17. Yu, J. (2012) Current understanding on aflatoxin biosynthesis and future perspective in reducing aflatoxin contamination. *Toxins (Basel), 4*(11), 1024-1057. doi: 10.3390/toxins4111024.

18. Yu, J., Bhatnagar, D., & Cleveland, T. E. (2004). Completed sequence of aflatoxin pathway gene cluster in Aspergillus parasiticus. *FEBS Lett, 564*(1-2), 126-130. doi: 10.1016/S0014-5793(04)00327-8.

19. Yu, J., Chang, P. K., Cary, J. W., Wright, M., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E., . . . Linz, J. E. (1995). Comparative mapping of aflatoxin pathway gene clusters in Aspergillus parasiticus and Aspergillus flavus. *Appl Environ Microbiol, 61*(6), 2365-2371.

20. Yu, J., Chang, P. K., Ehrlich, K. C., Cary, J. W., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E., . . . Bennett, J. W. (2004). Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. *Appl Environ Microbiol, 70*(3), 1253-1262.