

(مقاله پژوهشی)

جداسازی گونه‌های مولد سم آفلاتو کسین بر اساس ردیابی ژن‌های *ver1* و *aflR* و شناسایی گونه با تعیین توالی‌های ITS در برنج مصرفی مشهد خراسان

حامد فراجی^{۱*}، فریده طباطبایی یزدی^۲، نعمت الله رزمی^۳

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

۲- استاد، گروه علوم و صنایع 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 پذیرش: ۱۴۰۱/۰۷/۲۵

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۱۱

DOI: [10.30495/jfst.2022.1959801.1801](https://doi.org/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. آفلاتو کسین کی از متابولیت‌های ثانویه قارچی بوده و جزء خطرناک‌ترین سموم سرطان‌زا می‌باشد؛ دسته‌ای از قارچ‌های مولد سم آفلاتو کسین به طور بالقوه می‌توانند در غلات و خشکبار به شدت خطرناک باشند. از مهمترین قارچ‌های تولید کننده آفلاتو کسین، اسپرژیلوس فلاووس و اسپرژیلوس پارازیتیکوس می‌باشد. در این تحقیق جداسازی و شناسایی گونه‌های مولد سم آفلاتو کسین از برنج بر اساس روش‌های کشت و مورفولوژی پروپاگول‌های قارچی صورت پذیرفت سپس ژن‌های *ver1* و *aflR* که در بیوسنتز آفلاتو کسین نقش ساختمانی و تنظیمی دارند با پرایمر مخصوص تکثیر شده و عملیات الکتروفورز روی آن‌ها انجام شد و در نهایت جهت تایید روش مولکولی، اندازه گیری آفلاتو کسین با ستون‌های ایمونو افینیتی و دستگاه HPLC بر روی کشت‌های خالص جداسازی شده، انجام شد. نتایج نشان داد از ۶۰ نمونه جمع آوری شده، ۲۰ نمونه دارای قارچ‌های مولد آفلاتو کسین می‌باشند. ۲ نوع قارچ با خصوصیات مورفولوژیک مشابه اسپرژیلوس فلاووس و اسپرژیلوس پارازیتیکوس شناسایی شدند که توسط کشت روی محیط اختصاصی AFAP مورد تایید قرار گرفت. بر این اساس بررسی ژن‌های ساختاری و تنظیمی مهم مانند *ver1* و *aflR* جهت سنجش‌های اولیه حضور و آلودگی مواد غذایی مناسب و کارآمد بوده و پیشنهاد می‌گردد. تعیین توالی ITS نشان داد دو گونه اسپرژیلوس فلاووس Accession No MG430332.1 و اسپرژیلوس پارازیتیکوس Accession No MH937579.1 در برنج غالب هستند.

واژه‌های کلیدی: آفلاتو کسین، اسپرژیلوس، واکنش زنجیره ای پلیمرز.

۱- مقدمه

باتوجه به این که برنج مستعد آلودگی بادسته ای از اسپرژیلوس های دارای چرخه بیوسنتز آفلاتوکسین می باشد و از آنجایی که جزمهمترین مواد در رژیم غذایی مردم آسیا از جمله ابران است می تواند خطرات فراوانی برای سلامت جامعه ایجاد کند و به دلیل رطوبت بالا و شرایط کشت در شالیزار در مقایسه با بقیه غلات خشک مثل گندم، مستعد رشد قارچ های مولد سم می باشد. براین اساس در بسیاری از مقالات به تولید آفلاتوکسین به صورت انبوه در راکتور اشاره شده است که نشان می دهد برنج از نظر مواد غذایی و ریز مغذی ها، کاملاً بستر ساز تولید آفلاتوکسین است. آفلاتوکسین ها به عنوان خطرناک ترین مایکوتوکسین های شناخته شده، جز رده یک مواد سرطان زا می باشند. در بین اسپرژیلوس ها، اسپرژیلوس فلاووس، اسپرژیلوس پارازیتیکوس و اسپرژیلوس نومیوس قادر به تولید آفلاتوکسین هستند (۷). روش اصلی و معتبر اندازه گیری میزان آفلاتوکسین HPLC^۱ می باشد ولی به این دلیل که این روش هزینه بسیار بالایی دارد؛ ردیابی ژن های مهم در بیوسنتز آفلاتوکسین برای جداسازی اسپرژیلوس های مولد سم می تواند بسیار مقرون به صرفه و کارآمد باشد. آفلاتوکسین طی فرایند بیوسنتز پیچیده و چند مرحله ای تولید می شود نزدیک به ۲۰۰ ژن در تولید آفلاتوکسین نقش دارند بعضی از این ژن ها مانند afl R و ver 1 به لحاظ عملکرد اهمیت بیشتری دارند (۱۱). محصول ژنی ver 1 موجب تبدیل ورسیکولین ۲ به استریگماتوسیستین ۳ می شود که 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 روی ۴ متصل شونده به DNA می باشد؛ که با اتصال به DNA باعث کنترل فرایند تولید آفلاتوکسین می گردد (۵). بررسی دو ژن ساختاری و تنظیمی کمک می کند تا تولید آفلاتوکسین بصورت دقیق تری ارزیابی شود (۵، ۹). در تحقیقات ردی و همکاران،

قارچ های توکسین زای برنج مصرفی هند مورد مطالعه قرار گرفت که نشان داد گونه های اسپرژیلوس زیادی می توانند در برنج حضور داشته باشند و ارتباط بین گونه های توکسین زا و غیر توکسین زا را مورد بررسی قرار داد (۳). جداسازی مولکولی اسپرژیلوس های مولد سم در قهوه در سال ۲۰۰۵ صورت گرفت که نشان داد گونه های غالب در قهوه، اسپرژیلوس فلاووس و اسپرژیلوس اکراسئوس ۵ می باشند که به ترتیب تولید کننده آفلاتوکسین G و B و اکراتوکسین A هستند (۹). مطالعه انواع ژن های مشارکت کننده در تولید آفلاتوکسین شامل ژن های تنظیمی و ساختاری مانند ژن های ver 1، omt1، nor1 و aflR که توسط محققین زیادی انجام شده است؛ ضمن اینکه در این تحقیقات روش هایی برای شناسایی و تأیید تولید سم توسط گونه های توکسین زا ارائه گردیده است (۹). روش جداسازی مولکولی قارچ های مولد آفلاتوکسین می تواند جهت ارزیابی سریع آلودگی برنج و دیگر غلات مورد استفاده گسترده قرار گیرد. این مطالعه برای اولین بار بر روی برنج ایرانی صورت گرفت تا بتوان ضمن ارزیابی برنج از نظر قارچ های موجود و تولید توکسین در آن ها، روش مولکولی را با روش HPLC مقایسه نمود. هدف از انجام این تحقیق شناسایی مولکولی ۲ ژن مهم در تولید آفلاتوکسین در قارچ های جداسازی شده از برنج مصرفی مشهد می باشد تا بتوان به یک روش دقیق و سریع جهت غربالگری نمونه های غلات پی برد و با توجه به سرعت بالا و دقت زیاد روش مولکولی PCR می توان بر روی کل نمونه ها آزمون مولکولی انجام داد و فقط روی نمونه های مثبت، آزمون دقیق و گران قیمت HPLC را انجام داد.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- تهیه و نمونه برداری برنج

مجموعاً ۶۰ نمونه برنج از مراکز فروش سطح شهر و بصورت تصادفی تهیه و با روش های استاندارد ملی شماره ۶۸۷۲ همگن سازی شد. در این تحقیق از روش نمونه برداری کاملاً تصادفی استفاده شد و هیچ گونه آزمونی برای جداسازی یا ارزیابی اولیه آلودگی

1- High Performance Liquid Chromatography

2- Versicolin

3- Sterigmatocystin

4- Zinc Finger Protein

5- *Aspergillus ochraceus*

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، گرمخانه‌گذاری شد. در مرحله بعد ۵۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون جهت استخراج DNA طبق روش مبتنی بر تخریب دیواره‌ها با C-TAB^۵ و شوک حرارتی و ترسیب پروتئین‌ها بوسیله کلروفرم مورد استفاده قرار گرفت (۱۰). شستشوی DNA استخراجی طی چند مرحله با اتانول و ایزوپروپانول صورت پذیرفت تا به DNA ای با کیفیت و خالص دست پیدا کرد. DNA استخراجی در محلول ۱/۱ درصد بافر 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 در دمای منفی ۲۰ درجه سلسیوس نگهداری شد (۶).

۲-۴- واکنش‌های زنجیره ای پلیمرازی PCR

از ترمال سایکلر Bio Rad T-100 با قابلیت شیب دمایی برای PCR استفاده شد بهینه‌سازی دمای واسرشتگی با تکرار فرایند PCR انجام شد. PCR ژن‌های aflR، ver 1 و ITS با پرایمرهای اختصاصی انجام گردید در جدول ۱ اتوالی 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.

به قارچ صورت پذیرفت. 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 کشت عمومی DG18^۱ حاوی آنتی بیوتیک کلرامفنیکل صورت پذیرفت، بعد از گذشت ۵ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، کلنی‌های کشت شده در پلیت‌ها، جهت خالص‌سازی و شناسایی آسپرژیلوس‌ها مورد استفاده قرار گرفتند (۹). براساس خصوصیات ظاهری، رنگ، شکل کلنی و اسپرانژیوم، کونیدی و ساختار میسلیوم شناسایی اولیه انجام شد. براساس شکل ظاهری، از نوع و شکل آرایش اسپورها که در آسپرژیلوس فلاووس لبوله ۲ و کاملاً انتهایی به صورت جدا از هم و تقریباً منظم می‌باشد و در آسپرژیلوس پارازیتیکوس به صورت نامنظم و دارای سطح مشجروکنگره دار دیده می‌شود استفاده گردید. همچنین رنگ کلونی در آسپرژیلوس فلاووس زرد تا قهوه‌ای با ظاهر ابریشمی دارای رشته‌های کونیدی با دیواره ضخیم تقریباً ناصاف، کروی یا بیضوی می‌باشد در حالی که در آسپرژیلوس پارازیتیکوس رنگ کلونی سبز تا سبز لجنی با ظاهر کاملاً غیر ابریشمی و کونیدی دارای حاشیه تزئین دار یا خاردار می‌باشد جداسازی صورت پذیرفت (۷). سپس از کلنی‌های تایید شده کشت خالص روی محیط کشت AFP^۳ تهیه گردید تا براساس تغییر رنگ محیط کشت شناسایی بهتری صورت پذیرد.

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

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

جدول ۱- توالی پرایمر زن های *aflR* و *ver1* و ITS

Primer	Sequence	Base number	GC percent
Ver1 (forward primer)	5 GCCGCAGGCCGCGGAGAAAGTGGT 3	24	50
Ver 1 (reverse primer)	5 GGGGATATACTCCCCGCGACACAGCC 3	23	40
afl R (forward primer)	5 TATCTCCCCCGGGCATCTCCCGG 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

جدول ۲- غلظت و مقادیر مواد و واکنشگرها برای PCR زن های *aflR* و *ver1* و ITS

Reagent	Final concentration	Volume (ul)		
		<i>ver 1</i>	<i>aflR</i>	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

جدول ۳- مشخصات چرخه ها و زمان های مورد نیاز برای PCR زن های *aflR* و *ver1* و ITS

Steps	<i>ver1</i>	<i>aflR</i>	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

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 aflR 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 دو گونه 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 کاملاً جدیدی از آسپرژیلوس جداسازی و شناسایی شد که قادر به تولید آفلاتوکسین در غلات می‌باشد؛ این گونه آسپرژیلوس کوروجنیسیس^۳ بوده و قادر است آفلاتوکسین‌ها ی گروه B_۱, B_۲ را تولید کند. بنابراین در شرایط خاص، گونه‌های دیگر هم می‌توانند سهمی در تولید آفلاتوکسین در غلات داشته باشند (۱۳). برخی از گونه‌ها که فقط آفلاتوکسین B_۱, B_۲ را تولید کرده‌اند آسپرژیلوس فلاووس هستند و قارچ‌هایی که هر چهار نوع سم آفلاتوکسین را تولید کرده‌اند، آسپرژیلوس پارازیتیکوس یا آسپرژیلوس نومیوس^۴ 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

محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز افقی، برند Bio Rad مدل EH-1013 جداسازی شدند. مشخصات ژل الکتروفورز شامل یک درصد آگار در بافر^۱ TBE و دستگاه با ولتاژ ثابت ۱۰۰ ولت و زمان یک ساعت راه اندازی شد (۸). محصول PCR ۵۰۰ تا ۶۰۰ نوکلئوتیدی برای ژن aflR^۱ و ۲۰۰ نوکلئوتیدی برای ژن ver1 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 صورت پذیرفت. برای تایید روش مولکولی و صحت‌گذاری بر حضور دو ژن aflR و ver1 از روش اندازه‌گیری آفلاتوکسین به عنوان محصول اصلی این ژن‌ها، به وسیله ستون ایمونوآفینیتی و HPLC استفاده شد. اندازه‌گیری آفلاتوکسین در کشت خالص قارچ‌های جداسازی شده پس از ۷ روز گرمخانه‌گذاری 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 رقیق‌سازی، با عبور مقدار معینی عصاره از ستون ایمونوآفینیتی مخصوص آفلاتوکسین‌های گروه B و G فرایند تخلیص صورت پذیرفت (۱۴). در پایان با تزریق نمونه‌ها و استانداردهای کاری، تعیین مقدار نهایی انجام شد.

۴- 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 قابل شناسایی بودند که فرایند تأیید، با کشت روی محیط اختصاصی AFAP صورت گرفت. حضور دو گونه غالب در بیشتر جداسازی‌های سایر محققین هم دیده

3- *Aspergillus Chorangensis*

4- *Aspergillus Nomius*

1- Tris-borate-EDTA

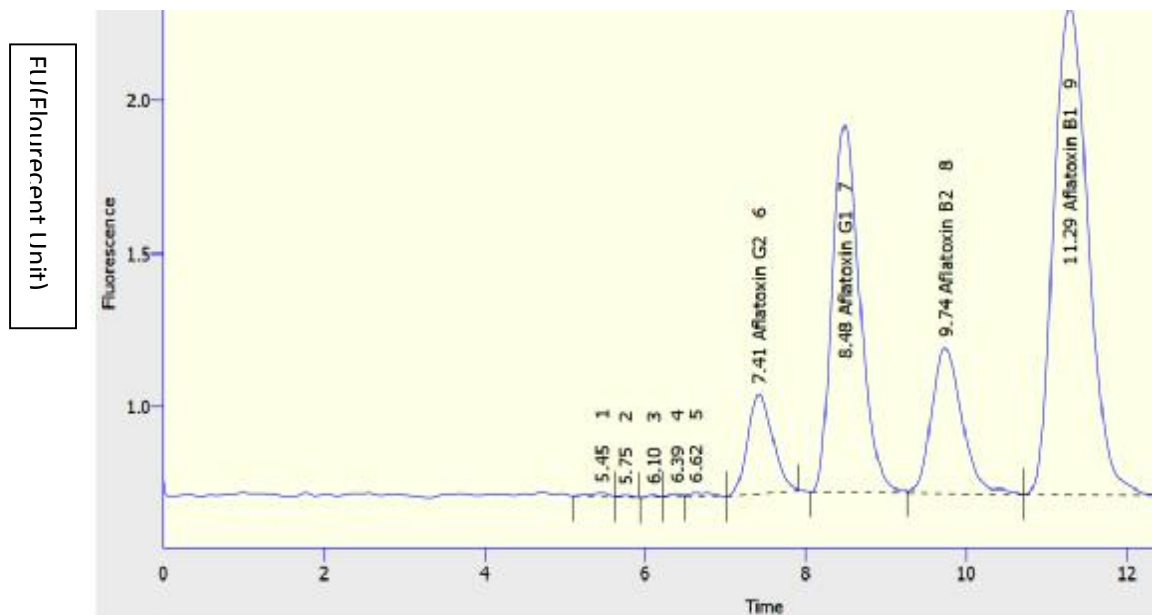
2- National Center for Biotechnology Information

فقط دو سم B1،B2 دیده شد و برای آسپرژیلوس پارازیتیکوس پارازیتیکوس دو گروه سم B، G شامل آفلاتوکسین های B1،B2، G1، G2 دیده شدند (۲،۱۳). نتایج تجزیه دستگامی نشان داد سه سویه از سویه های مشکوک به آسپرژیلوس پارازیتیکوس توان تولید هر ۴ نوع سم آفلاتوکسین را دارا می باشند و بدین ترتیب از آن جا که تولید آفلاتوکسین های B1،B2،G1،G2 توسط آسپرژیلوس پارازیتیکوس انجام می شود (۱۲)، احتمال این که سویه های جداسازی شده آسپرژیلوس پارازیتیکوس باشند را تقویت می نماید.

را نداشتند. نتایج تعیین توالی نشان داد دو گونه آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس در برنج حضور دارند شناسه گونه ها، میزان تطابق و کد اختصاصی برای ردیابی در سایت NCBI و بانک ژنی در جدول ۴ نشان داده شده است. این یافته ها با مطالعه کشت های خالص و ریخت شناختی آن ها مورد تأیید قرار گرفت. همچنین از روی متابولیت های ثانویه تولید شده توسط این دو گونه (آفلاتوکسین های B، G) که به وسیله HPLC اندازه گیری شده بودند نتایج جداسازی مولکولی تأیید گردید بدین ترتیب که گونه آسپرژیلوس فلاووس تنها توان تولید آفلاتوکسین های گروه B را دارد که در آنالیز HPLC

جدول ۴ - مشخصات گونه های جداسازی شده بر اساس توالی های ITS و مقایسه با بانک ژنی

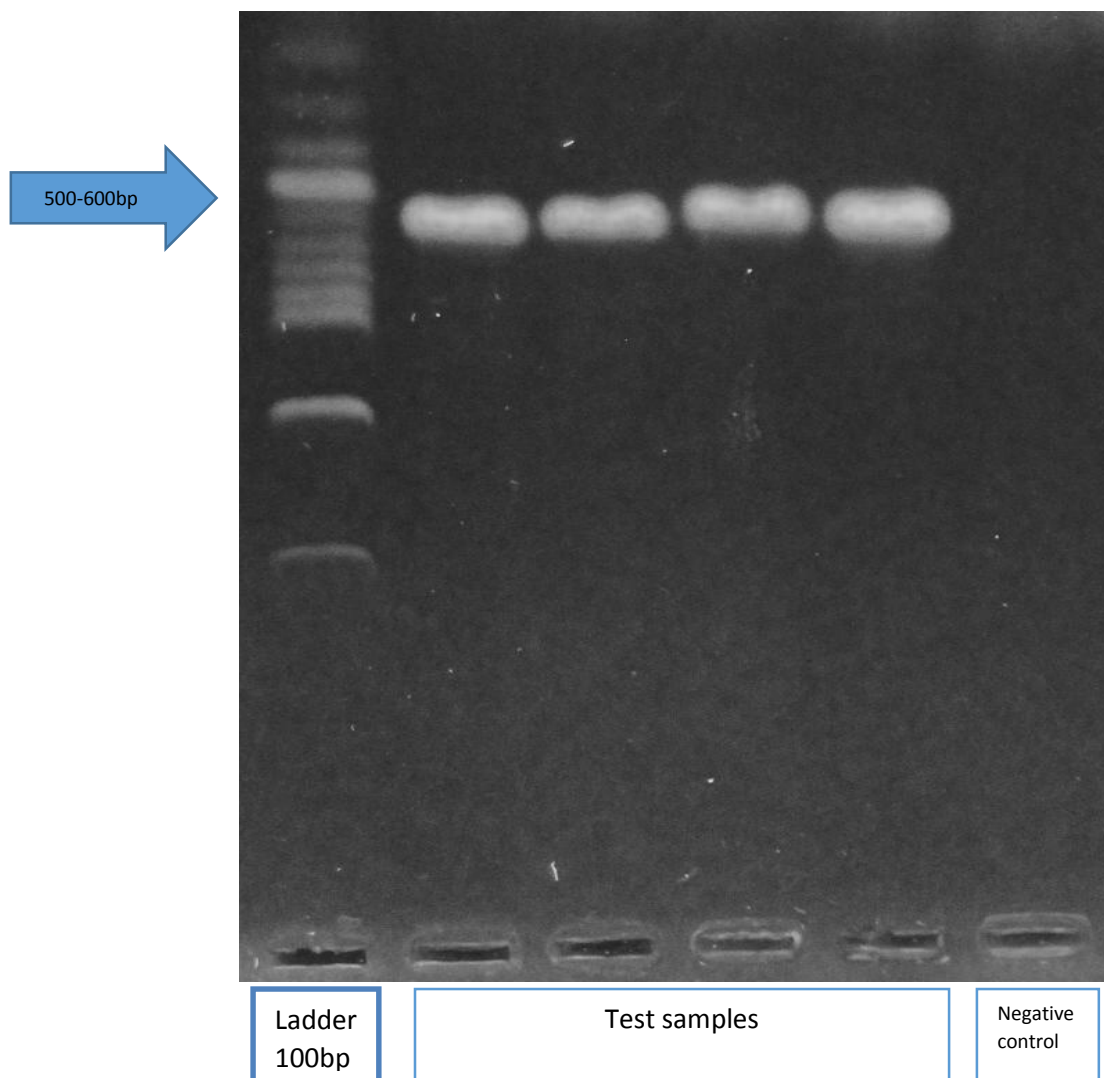
ردیف	شناسه توالی	میزان تطابق (درصد)	جنس و گونه	شماره اختصاصی سویه
۱	TS-1	۹۹/۱۳	آسپرژیلوس فلاووس	MG430332.1
۲	TS-5	۱۰۰	آسپرژیلوس پارازیتیکوس	MH937579.1



شکل ۱- کروماتوگرام آفلاتوکسین های B،G : زمان ماند برای آفلاتوکسین های B1،B2،G1،G2

مثبت برای نتایج آزمون‌های مولکولی PCR و اندازه‌گیری آفلاتوکسین با سویه قارچ اسپرژیلوس فلاووس خالص با شماره شناسایی PTTC No: 5018 تهیه شده از مرکز کلکسیون قارچ و باکتری ایران انجام شد. (۴)

آزمون‌های مولکولی حضور ژنهای اختصاصی *ver 1* , *afIR* 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



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

این اساس، با توجه به دقت بالای شناسایی دو ژن *afIR* , *ver 1* به عنوان روشی سریع و کم‌هزینه در مقایسه با روش‌های کشت و شناسایی مورفولوژیک قارچ، می‌تواند جهت جداسازی گونه‌های مولد آفلاتوکسین، به‌خوبی موثر باشد. دو گونه مولد آفلاتوکسین

۴- 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

- 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.

جداسازی شده کاملاً با گونه‌های شایع در سایر غلات مطابقت دارند و نشان می‌دهد این گونه‌ها گسترش بسیار زیادی دارند و کنترل آلودگی از مراحل ابتدایی بسیار مهم‌تر از فرایندهای کنترلی 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 فرآورده‌های غذایی بر مصرف مانند برنج برای ارائه محصولات سالم و طبیعی پیشنهاد می‌گردد.

۵- سپاسگزاری

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

۶- منابع

1. Davari E, Mohsenzadeh M, Mohammadi, G. and Rezaeian-Doloei, R. Characterization of aflatoxinogenic *Aspergillus flavus* 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, BAttìLani 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*

(Original Research Paper)

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

Hamed Faraji^{1*}, Farideh Tabatabaee Yazdi², Nematollah Razmi³

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](https://doi.org/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 flavus* 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 flavus* 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