بررسی بیان ژن aflR در قارچ آسپرژیلوس فلاووس توکسین‌زای جداشده از پسته‌های شهر رفسنجان به روش مولکولی RT-PCR

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: ۱۳۹۷/۰۹/۱۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۱۵)

چکیده

مایکوتوکسین‌ها از متابولیت‌های ثانویه قارچ‌ها هستند که بوسیله تعدادی از قارچ‌ها بویژه آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس تولید می‌شوند و می‌توانند سرطانزا باشند. مواد غذایی در شرایط آب و هوای گرم بستری مناسب برای آلودگی به انواع کپک‌ها بخصوص گونه‌های آسپرژیلوس توکسین زا هستند و بدنبال آن باعث تولید آفلا توکسین در مراحل مختلف محصول، هنگام برداشت و حمل و نگهداری آن می‌باشند. از آنجایی که ایران یکی از بزرگترین صادرکنندگان پسته درجهان است و یکی از آلودگی‌های مهم پسته آفلاتوکسین است.

هدف از این پژوهش بررسی بیان ژن aflR در قارچ‌های آسپرژیلوس فلاووس توکسین‌زای جدا شده از پسته‌های شهر رفسنجان به روش مولکولی RT-PCR می‌باشد. این ژن نقش تنظیم کننده در بیان دیگر ژن‌های مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین را دارد. در این پژوهش به طور تصادفی از ۱۰ خشکبار فروشی در نقاط مختلف شهر، نمونه‌های پسته‌ی شهررفسنجان جمع آوری و یک مجموعه از۱۰۰۰ نمونه پسته جمع آوری شد، سپس قارچ‌های موجود با تکنیک‌های میکروبی جداسازی شدند. با بررسی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی وجود قارچ آسپرژیلوس فلاووس، تایید شد. سپس محتویات ژنومی و RNA قارچ‌های توکسین‌زا استخراج، تخلیص و آزمایش RT-PCR جهت بررسی بیان ژن مورد نظر انجام شد. در این تحقیق ۴۲ سویه قارچ آسپرژیلوس فلاووس جدا شده از پسته‌های محصول شهر رفسنجان مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت ۹ نمونه از ۴۲(۲۱/۴٪) نمونه‌ی بررسی شده برای ژنaflR دارای بیان و به عبارت دیگر توکسین‌زا بودند.

کلیدواژگان

RT-PCR، آسپرژیلوس فلاووس، پسته، ژن aflR.

* نویسنده مسئول، رایانامه: saghazadeh_99@yahoo.com

مقدمه

آسپرژیلوس‌ها یکی از شایع ترین قارچ‌های محیطی هستند که در حدود ۹۰۰ گونه برای آن‌ها شناسایی شده است. تعدادی ازگونه‌ها متابولیت‌های ثانویه مفیدی مانند آنتی بیوتیک‌ها و داروها را تولید می‌کنند (Brakhage et al., 2008; Yu, 2012) و برخی نیز قادرند تولید سم کنند. مایکوتوکسین‌ها دارای ساختارهای شیمیایی، تاثیرات و فعالیت‌های زیستی بسیار گوناگونی هستند. (Sweeney& Dobson, 1998) در جنس آسپرژیلوس، آسپرژیلوس فلاووس از نظر اقتصادی و غذایی بسیار مهم است زیرا تولیدکننده 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 B2 را تولید می‌کنند، درعین حال آسپرژیلوس پارازیتیکوس نیز آفلاتوکسین‌های نوع G1،B2،B1 و 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 می‌دهد و guanynl-N7 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 می‌باشد، 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 می‌کند.

با توجه به اینکه تاکنون تحقیقی در خصوص جداسازی و شناسایی قارچ آسپرژیلوس فلاووس توکسین‌زا 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 شماره‌ی III قارچ در فاصله‌ی ۸۰kb تلومر جای گرفته‌اند (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. ژن aflR یکی از این ژن‌ها است. این ژن یک تنظیم کننده‌ی فعال مثبت است که در میان ژن‌های این خوشه قرار دارد که یک پروتئین ۴۷کیلو دالتونی اتصال شونده به DNA (zinc-finger DNA binding protein) به نام AFLR را کد می‌کند و برای شروع رونویسی ژن‌های خوشه‌ی بیوسنتز آفلاتوکسین لازم است (Chang, Ehrlich, Yu, Bhatnagar, & Cleveland, 1995; Yu, Bhatnagar, et al., 2004). حذف ژن aflR در آسپرژیلوس پارازیتیکوس، بیان دیگر ژن‌های مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین را متوقف می‌کند (Cary, Ehrlich, Wright, Chang, & Bhatnagar, 2000). پس از آنجایی که این ژن، یک ژن کلیدی برای برای تنظیم بیان دیگر ژن‌های مسیر بیوسنتز و نهایتا تولید آفلاتوکسین نهایی در آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارایتیکوس است می‌توان از بررسی آن برای تشخیص توانایی تولید توکسین در قارچها بهره برد. هدف ازاین پژوهش نیز بررسی پراکندگی قارچ‌های آسپرژیلوس فلاووس توکسین‌زا (واجد ژن aflR) 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 از ۱۰۰۰ 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 $6C^{o}$-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 و۱mlاز 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 RNA توسط کیت Total RNA Purification Kit شرکت Jena Bioscience GmbH مطابق 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 cDNAمی‌پردازیم 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 cDNAسنتز شده PCR انجام می‌دهیم و صحت کار خود را با مشاهده جواب و مقایسه با کنترل مثبت تایید می‌نماییم. طراحی پرایمر اختصاصی برای ژنهایaflR و بتااکتین (به عنوان استاندارد داخلی و ژن خانه دار"House keeping"، جهت آزمایش RT- PCR انجام شد (جدول ۱)

جدول ۱- توالی پرایمر ژن aflR

Forward	5'- TGA CCC ACC TCT TCC CCC CGC -3'
Reverse	5'- CCG TCA GAC AGC CAC TGG ACA GGC-3'

آزمایش RT-PCR

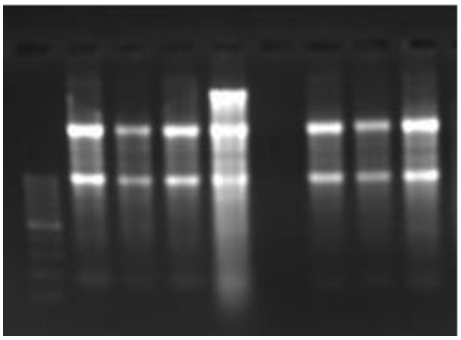
بدین منظور مواد لازم با مقادیر مشخص شده در زیر برای هر نمونه با حجم نهایی ۱۲µL، مورد استفاده قرار گرفت. مقادیربه این شرح است: Mastermix, Water ،cDNA 1µL،Primers 0. 5µL ،amplicon 6µL 4µL. در نهایت میکروتیوب‌ها در دستگاه ترموسایکلر با شرایط دمایی جداول زیر گذاشته شد.

جدول ۲- شرایط دمایی برای پرایمر بتااکتین و aflR

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

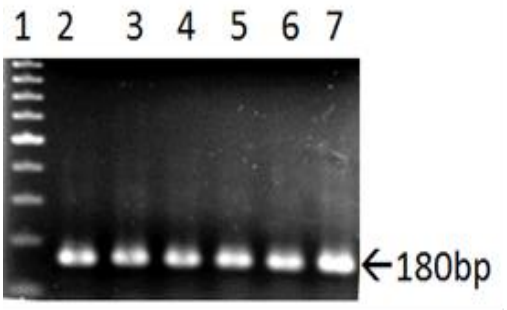
نتایج

برای ارزیابی کیفیت و کمیت RNA استخراج شده، به ترتیب از الکتروفورز با ژل آگارز (شکل ۱) واسپکتروفتومتر (Nano Drop) استفاده شد. نتایج حاکی ازخلوص و یکپارچگی RNA استخراج شده از بافت بود. یادآوری می‌گردد که کنترل مثبت در این آزمایش، نمونه قارچ آسپرژیلوس فلاووس توکسین زا خریداری شده از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران می‌باشد.

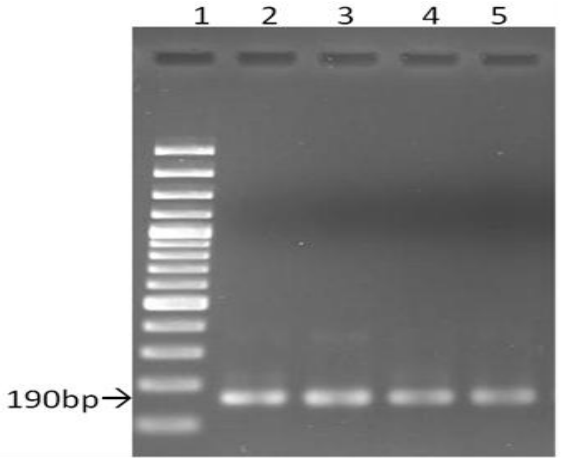


شکل ۱- سمت چپ- الگوی RNAاستخراج شده از نمونه‌های قارچی برروی آگارز ۱/۵٪

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



شکل ۲- 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 می‌باشد و تمامی نمونه‌ها برای این ژن خانه دار دارای بیان بود.



شکل ۳- الگوی حاصل از قطعات cDNA تکثیر شده توسط پرایمر ژن aflRبا آزمایش RT-PCR بر روی آگارز۱/۵٪. در تصویر بالا به ترتیب از چپ به راست: لاین ۱: سایز مارکر ۱۰۰bp از شرکت fermentase کانادا، لاین ۲: کنترل مثبت، لاین‌های ۳ تا ۵: چند تا از نمونه‌ها که برای ژن aflR دارای بیان بود. اندازه قطعه تکثیر شده برای این ژن، ۱۹۰bp می‌باشد.

هدف از این مطالعه، بررسی بیان ژن aflR در قارچ آسپرژیلوس فلاووس توکسین زا جدا شده از پسته‌های شهر رفسنجان 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 aflR 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 می‌باشد.

بحث

مایکوتوکسین‌ها متابولیت‌های ثانویه قارچی هستندکه به دنبال رشد قارچ‌های توکسین‌زا در مواد غذایی،تولید و کیفیت آن‌ها را تحت تاثیر 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. مسئلهآلودگی 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 پژوهش پیش رو نیز، بررسی بیان ژن aflR در قارچ آسپرژیلوس فلاووس توکسین زا جدا شده از پسته‌های شهر رفسنجان به روش مولکولی RT-PCR می‌باشد. ژن aflR یک ژن تنظیمی است که وجود آن برای بیان دیگر ژن‌ها دخیل در مسیر بیوسنتز سم آفلاتوکسین ضروری می‌باشد بطوریکه حذف آن می‌تواند سبب عدم بیان دیگر ژن‌های این مسیر بیوسنتز شود. 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 می‌باشد. درنهایت ۹ نمونه از ۴۲(۲۱/۴٪) نمونه‌ی بررسی شده دارای بیان در ژن aflR و بعبارتی توکسین‌زا بودند. در راستای همین بررسی می‌توان مطالعه‌ینوربخش و همکاران (۲۰۰۹) اشاره کرد، آن‌ها به بررسی ژن aflR را به منظور جداسازی سویه‌های قارچی مولد آفلاتوکسین در زعفران انجام بر پایه‌ی واکنش PCR پرداختند که نتایج نشان داد از ۳۷ نمونه زعفران ۱۸/۹٪ نمونه‌ها واجد قارچ‌های توکسینزا بودند (Noorbakhsh, 2009). درسال ۲۰۰۱، کرایسئو و همکارن پژوهشی جهت جداسازی قارچ‌های آسپرژیلوس فلاووس مولد آفلاتوکسین برپایه‌ی روش PCR برای ژن‌ها omt-A,ver-1,nor-1,aflR انجام داد که نتایج آن نشان دادند 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 HPLCو TLCبود که مشخص گردید در ۳۳۵۶ نمونه این تحقیق، ۱۱/۸٪ نمونه‌ها بیشتر از حد مجاز آفلاتوکسینB1 در ایران، یعنی µg ۵ 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 می‌دهند که آلودگی به آفلاتوکسین B1به 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 می‌تواند 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 می‌تواند 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 می‌باشد. در نهایت می‌توان گفت بهترین اقدام برای جلوگیری از پیامدهای آفلاتوکسین و کاهش میزان آفلاتوکسین B_1 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. Noorbakhsh ,R., A. R., Bahrami, S. A., Mortazavi, B., Forghani, M., Bahreini. (2009). PCR-based identification of aflatoxigenic fungi associated with Iranian saffron. *Food Science and Biotechnology*(18(4)), 1038-1041.
12. 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.
13. 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.
14. Sweeney, M. J., & Dobson, A. D. (1998). Mycotoxin production by Aspergillus, Fusarium and Penicillium species. *Int J Food Microbiol, 43*(3), 141-158.
15. 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.
16. Van Egmond, H. P. J., M. A. (2005). Worldwide Regulations on Aflatoxins. *CRC Press: Boca Raton, FL, USA*, 77–93.
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.